

Regulatorfunktion
spezifischer Transfer-Ribonukleinsäuren im
Entwicklungszyklus des Schleimpilzes
Dictyostelium Discoideum

von
Theodor Dingermann
aus
Kevelaer

Regulatorfunktion
spezifischer Transfer-Ribonukleinsäuren im
Entwicklungszyklus des Schleimpilzes
Dictyostelium Discoideum

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Theodor Dingermann

aus

Kevelaer

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 2. 1980

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter:

Professor Dr. H. Kersten

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. E. Schweizer



Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H. Kersten
- Arbeitsgruppe Biochemie -
Fachbereich Biologie/Chemie
an der Universität Erlangen - Nürnberg durchgeführt



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546209_0064

Für meine Eltern und für Gertrud

Abkürzungen

A

A₂₆₀

1 A₂₆₀ Einheit

Ac-

ATP

PD-Cellulose

R-ME

C

C²

cpm

DEAE

Dimethyl-FOFOP

DNA

dT

EDTA

G

Hepes

Hn-RNA

M

MES

Modifizierte Nukleoside

m¹A

m⁶A

t⁶A

m³C

m⁵C

Adenosin

Absorption bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke

RNA-Menge, die in 1 ml Wasser gelöst bei 260 nm und 1 cm Lichtweg eine Absorption von 1 ergibt (= 44 µg RNA)

Acetyl

Adenosintriphosphat

Benzoylierte DEAE-Cellulose

2-Mercapto-Äthanol

Cytidin

Curie

Impulse pro Minute

Diäthylaminoäthyl

1,4-bis-(2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazol)-Benzol

Desoxyribonukleinsäure

Desoxythymidin

Äthylendiamintetraessigsäure

Guanosin

(N-2-hydroxyäthylpiperazin-N'-2-Äthansulfonsäure)-Na-Salz

Heterogene Kern RNA

molar

Morpholinäthansulfonsäure

1-Methyladenosin

6-Methyladenosin

N-(N-(9-β-D-Ribofuranosylpurin-6-yl)carbamoyl)threonin

3-Methylcytidin

5-Methylcytidin

D	Dihydrouridin
m ¹ G	1-Methylguanosin
m ² G	2-Methylguanosin
m ⁷ G	7-Methylguanosin
m ² ₂ G	N ² ,N ² -Dimethylguanosin
Gm	2'-O-Methylguanosin
I	Inosin
ψ	Pseudouridin
Q	7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosin
m ⁵ U, rT	Ribothymidin
Tm	2'-O-Methyl-Ribothymidin
m-RNA	Messenger Ribonukleinsäure
P	Phosphat
Poly-A	Polyadenylsäure
Poly-Phe	Polyphenylalanin
PFO	2,5-Diphenylphenoxazol
RNAase	Ribonuklease
RPC	Reversed Phase Chromatographie
r-RNA	ribosomale RNA
S	Sedimentations Einheit
S-100	Überstand nach Zentrifugation des Zellsaftes mit 100 000 x g
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Na-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TMED	N,N,N',N'-Tertramethyläthylen-diamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uracil
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	4
2.1.	Der Organismus	14
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Material	27
3.2.	Zuchtbedingungen	30
3.3.	Präparation von Gesamt-t-RNA	32
3.4.	Reinheitsprüfung von t-RNA	35
3.5.	Präparation t-RNA-freier ribosomaler RNA	37
3.6.	Präparation von Enzymextrakten	39
3.7.	Aminoacylierung von t-RNA	40
3.8.	Methylierung von t-RNA aus Dictyostelium mit einem S-30 Enzymextrakt aus E. coli	41
3.9.	Bausteinanalyse von t-RNAs	42
3.10.	Präparation von Polysomen	46
3.11.	RPO-5 Chromatographie	46
3.12.	Zweidimensionale Polyacrylamidgel- Elektrophorese	47
3.13.	Mapping eines zweidimensionalen Poly- acrylamidgels von t-RNA aus Dictyo- stelium Discoideum	51
3.14.	Messung des Beladungszustandes von t-RNAs in vivo	52
3.15.	In vitro Markierung von t-RNA-Fragmenten mit γ - ³² P-ATP und Polynukleotidkinase aus mit T ₄ Phagen infiziertem E. coli	54
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Isolierung von Gesamt-t-RNA aus Dictyo- stelium Discoideum	56

4.2.	Modifikationen der t-RNA aus Dictyostelium zu verschiedenen Zeiten des Lebenszyklus	58
4.2.1.	Modifikationsmuster der Gesamt-t-RNA	59
4.2.2.	Quantitative Zusammensetzung der Nukleoside der t-RNA	62
4.3.	Zweidimensionale Trennung der spezifischen t-RNAs aus Dictyostelium Discoideum in Polyacrylamidgelen	66
4.3.1.	Abänderung des in der Literatur beschriebenen Verfahrens	66
4.3.2.	Trennung spezifischer t-RNAs aus vegetativen Zellen und Zellen, die 14 Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt wurden	67
4.3.3.	Identifizierung spezifischer t-RNAs des Gelmusters	69
4.4.	Heterologe Methylierung von t-RNA aus Dictyostelium Discoideum mit dem Enzymextrakt aus E. coli	79
4.4.1.	Methylierungsansatz	80
4.4.2.	Methylierung in Abhängigkeit von der S-Adenosyl-Methionin Konzentration	81
4.4.3.	Methylierung in Abhängigkeit von der t-RNA Konzentration	82
4.4.4.	Produktanalyse	83
4.4.5.	U 54 t-RNAs aus vegetativen Zellen und aus Zellen des Preaggregationsstadiums	84
4.5.	Charakterisierung von t-RNA ^{Asn} ₂	88
4.5.1.	Neusynthetisierte t-RNAs während des vegetativen Wachstums und während der Preaggregation	88

4.5.2.	Welches Nukleotid findet sich an der Position 54 in der t-RNA ^{Asn} ₂ ?	90
4.5.3.	Enthält die t-RNA ^{Asn} ₂ die Hypermodifikation Q ?	95
4.6.	Verteilung von t-RNAs mit einem Ribothymidin an der Position 54 und t-RNAs mit einem U 54 im Gesamtzellextrakt und an den Polysomen	97
4.6.1.	Isolierung von Polysomen	98
4.6.2.	Isolierung der t-RNAs aus der Polysomenfraktion und aus den Zellen	99
4.6.3.	Heterologe Methylierung von polysomaler- und Gesamtzell-t-RNA	101
4.6.4.	Trennung der methylierten t-RNAs durch zweidimensionale Polyacrylamidgel Elektrophorese	102
4.7.	Bestimmung des Beladungszustands der t-RNAs in vivo	107
4.7.1.	Bestimmung der Proteinbiosyntheserate und des Polysomen/Monosomen Verhältnisses nach Behandlung vegetativer Zellen mit dem Histidinanalogon Histidinol	109
4.7.2.	In vivo Beladungszustand von t-RNA zu verschiedenen Zeiten des Entwicklungszyklus	112
4.7.3.	Beladungszustand der Isoakzeptoren t-RNA ^{Asn} ₂ und t-RNA ^{Asn} ₃ in vivo	115
4.8.	Michaelis-Menten-Kinetik der Aspariginylsynthetase	118
4.9.	Vergleich der Struktur von t-RNA ^{Asn} ₂ und t-RNA ^{Asn} ₃	121

4.9.1.	Isolierung von t-RNA ₂ ^{Asn} und t-RNA ₃ ^{Asn}	121
4.9.2.	In vitro-Markierung der t-RNAs mit ³² P	126
4.9.3.	Nukleotidanalyse der beiden t-RNAs	126
4.9.4.	Fingerprintanalyse von t-RNA ₂ ^{Asn} und t-RNA ₃ ^{Asn}	130
5.	Diskussion	133

1.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob spezifische Transfer-Ribonukleinsäuren im Entwicklungszyklus des Schleimpilzes *Dictyostelium Discoideum* regulatorische Funktionen haben. Die wichtigsten Befunde sind:

- A. Im Verlauf der Entwicklung von vegetativ wachsenden Amöben zu Sporen unterscheiden sich die Transfer-Ribonukleinsäuren durch ihren Gehalt an modifizierten Nukleosiden. Die Gehalte an 5-methyl-Cytosin und Pseudouridin nehmen geringfügig ab, der Gehalt an Ribothymidin (rT) vermindert sich beträchtlich, von 0,9 mol% in vegetativen Amöben auf 0,4 mol% in den Sporen.
- B. Ribothymidin kommt in vielen t-RNA Spezies in Position 54 vor. Diese Modifikation kann teilweise durch ein Uridin ersetzt sein. Durch zweidimensionale Elektrophorese gelang es, die Gesamt-t-RNA von *Dictyostelium* in 40 Spezies zu trennen. Spezifische t-RNAs mit einem Uridin an Position 54 ließen sich mit der t-RNA-(Uracil-5-)methyltransferase aus *Escherichia coli* und ^3H -S-Adenosyl-methionin und durch Fluorographie auf den zweidimensionalen Elektropherogrammen nachweisen. In Zellen des frühen Entwicklungsstadiums der Preaggregation wurde eine für Asparagin spezifische Transfer-Ribonukleinsäure mit Uridin an der Position 54 gefunden, die in vegetativen Zellen nicht nachzuweisen war.
- C. In *Dictyostelium* kommen drei verschiedene t-RNA^{Asn} Isoakzeptoren vor. Die t-RNA^{Asn}₁ wurde nicht näher untersucht. Die für das Preaggregationsstadium spezifische t-RNA wurde von uns als t-RNA^{Asn}₂ identifiziert. Die beiden t-RNA^{Asn}-Hauptisoakzeptoren 2 und 3 wurden getrennt isoliert und Teilsequenzen ermittelt. Ferner wurde versucht, die Sequenzen der beiden t-RNAs zu bestimmen. Hierzu wurde eine 1979 beschrie-

bene Methode angewandt, mit der es gelang, spezifische Prokaryonten t-RNAs in wenigen Tagen zu sequenzieren. Dieses Verfahren läßt sich nach unseren Erfahrungen und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitskreise nicht ohne weiteres auf eukaryontische t-RNA übertragen. Hierzu sind konventionelle Methoden unerlässlich.

Die Analyse von t-RNA^{Asn}₂ ergab, daß diese t-RNA an der Position 54 nicht einheitlich modifiziert ist, sondern zum Teil Uridin, zum Teil Ribothymidin enthält.

- D. Für eukaryontische t-RNAs mit wechselndem Verhältnis von Uridin zu Ribothymidin wird eine regulatorische Funktion in der Proteinbiosynthese diskutiert. Uns gelang der Nachweis, daß die rT-haltigen Molekülspezies bevorzugt für die Proteinbiosynthese verwendet werden: die rT-haltigen t-RNAs finden sich bevorzugt an den Polyribosomen, die U 54 Analogen im Cytosol. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, daß die rT-haltigen t-RNAs in Eukaryonten effizienter in der Proteinbiosynthese sind und daß das Verhältnis von U/rT in der Position 54 für die Regulation der Proteinbiosynthese von Bedeutung ist.

- E. Eine weitere regulatorische Funktion von spezifischen t-RNAs beim Übergang vom vegetativen Wachstum in die Entwicklungsphase wurde für die Isoakzeptoren t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃ gezeigt. Von beiden t-RNA Isoakzeptoren liegt in der Zelle wenige Minuten nach Beginn der Entwicklung der Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₃ völlig deazyliert vor, während die t-RNA^{Asn}₂ nur noch zu 50% aminoazyliert ist. Alle anderen t-RNAs sind zu 70% - 100% aminoazyliert. Die Unterbeladung der t-RNA^{Asn} führt zur Hemmung des Elongationsschrittes in der Proteinbiosynthese und könnte den in der Literatur beschriebenen Zerfall der Polysomen in diesem frühen Entwicklungsstadium signalisieren. Der Polysomenzerfall ist korreliert mit einer Initiationskontrolle; es werden nur noch ganz bestimmte für das Entwicklungs-

stadium spezifische m-RNAs translatiert.

Messung der Michaelis Menten Konstanten von Asparagin für die Komplexe von t-RNA^{Asn}₂ bzw. t-RNA^{Asn}₃ mit dem Enzym ergaben für den t-RNA^{Asn}₂-Komplex einen Wert von 1,28 μ M und für den t-RNA^{Asn}₃-Komplex einen Wert von 4,65 μ M. Diese Unterschiede könnten die beobachtete unterschiedliche Beladung erklären.

7. Von den beiden für Asparagin spezifischen Isoakzeptoren wurden von uns aus 76 Litern Zellkultur jeweils 10 μ g in reiner Form isoliert. Die Oligonukleotidmuster und die Nukleotid-Analysen ergaben, daß sich die beiden t-RNA-Isoakzeptoren trotz großer Homologien in der Primärstruktur unterscheiden. So enthält nur die t-RNA^{Asn}₂ die Modifikation Q, ein hypermodifiziertes Nukleosid der Zusammensetzung: 7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosin. In der t-RNA^{Asn}₃ wurden die Modifikation 6-threonyl-Adenosin und größere Mengen von 2'-O-methyl-Guanosin gefunden, die in t-RNA^{Asn}₂ fehlen.

In vielen Eukaryonten, die ein Entwicklungsstadium durchlaufen sowie auch in Virus-transformierten Zellen ändern sich die Muster der Transfer-Ribonukleinsäuren, die das modifizierte Nukleosid Q in der ersten Position des Antikodons enthalten (t-RNAs für Asparagin, Asparaginsäure, Histidin und Tyrosin). Es ist daher möglich, daß den t-RNA^{Asn}-Isoakzeptoren eine generelle Funktion in der Translationskontrolle zukommt.

2. Einleitung

Transfer-Ribonukleinsäuren (t-RNAs) haben in der Zelle zentrale Funktionen bei der Proteinbiosynthese:

1. Aktivierung der Aminosäuren
2. Erkennung des Elongationsfaktors TU
3. Entschlüsseln der m-RNA
4. Erkennung des Initiationsfaktors durch die Initiator-t-RNA

Darüber hinaus sind sie an anderen Biosynthesewegen beteiligt. Hierzu gehören die Biosynthese der Zellwand, Die Modifikation von Proteinen und die Synthese einiger Peptidantibiotika.

Ferner spielen sie eine wichtige Rolle bei Regulationsprozessen, deren molekularen Mechanismen zur Zeit intensiv studiert werden.

In Tabelle 1 sind die bisher bekannten Funktionen von Transfer-Ribonukleinsäuren zusammengestellt.

Tab. 1: Biologische Aktivitäten der t-RNA (Clark, 1978)

Protein Biosynthesis

1. Activation of amino acids
2. Recognition by EF-Tu
3. Location in A-site
4. Decoding mRNA
5. Signal for magic spot
9. Regulation
 - a. Repressor
 - b. Feedback inhibitor
 - c. Suppression

Initiation

6. Recognition of initiator tRNA by IF
7. Location in I-site (part of P-site)
8. Recognition by transformylase

RNA Metabolism

10. As precursor recognized by cleavage and maturation enzymes
11. Enzymes for making modified bases
12. C-C-A repair enzyme
13. Pep-tRNA degraded by hydrolase
14. Nuclease degradation
15. Reverse transcriptase primer
16. Selection during viral encapsulation
17. Correlation with 3'-end of viral RNA
18. Alteration of *E. coli* endo I specificity

Aminoacyl-tRNA Transferases

19. Cell-wall biosynthesis
20. Membrane components
21. Protein modification

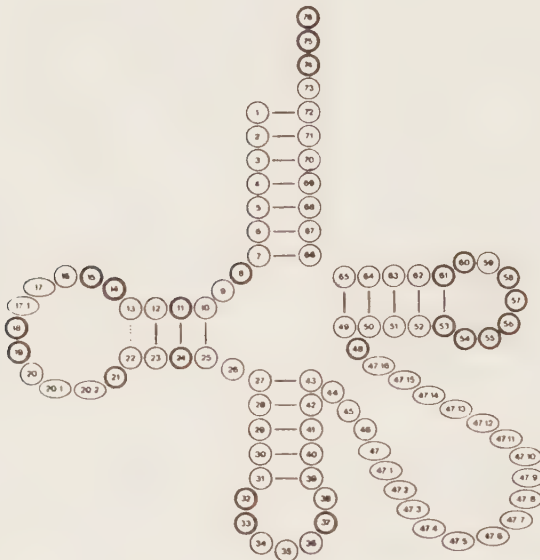
Jede t-RNA wird mit einer für sie spezifischen Aminosäure beladen. Berg et al. (1961) erkannten als erste, daß es für ein und dieselbe Aminosäure mehrere verschiedene t-RNA Spezies, sog. Isoacceptoren, geben kann, die sich chromatographisch voneinander trennen. Diese Isoacceptoren unterscheiden sich entweder in ihrer Nukleotidsequenz, sie wurden von White et al. (1973) als heterogeneische Isoacceptoren bezeichnet, oder bei gleicher Primärstruktur können sich t-RNA Isoacceptoren in ihrem Gehalt an modifizierten Basen unterscheiden (homogeneische Isoacceptoren). Ob es sich bei diesen Isoacceptoren um Intermediate handelt, die im Verlaufe der Synthese entstehen, oder ob t-RNA Isoacceptoren mit unterschiedlichen Modifikationen auch funktionelle Bedeutung haben, ist Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Je nach Organismus enthält eine Zelle ca. 40-60 t-RNA-Spezies. Die t-RNAs enthalten ca. 74-94 Nukleoside, die für alle t-RNAs eine kleeblattartige Sekundärstruktur ergeben. Die Röntgenstrukturanalysen kristallisierter t-RNA^{Phe} und t-RNA^{Met}_f aus Hefe zeigten, daß die t-RNAs in einer L-förmigen Tertiärstruktur vorliegen.

Auf dem Cold Spring Harbor Meeting 1978 wurde eine einheitliche Zählweise für die Nukleoside in den t-RNAs vereinbart (Abb. 1).

Im Gegensatz zu anderen Ribonukleinsäuren enthält die t-RNA außer den Nukleosiden Adenosin, Cytidin, Guanosin und Uridin eine große Anzahl modifizierter Nukleoside. Dies können methylierte Basen sein, wie z.B. 5-methyl-Cytosin (m^5C), 7-methyl-Guanin (m^7G), 5-methyl-Uracil (m^5U) oder Nukleoside, die an der 2'-OH Gruppe der Ribose methyliert sind, wie 2'-O-Guanosin (Gm), 2'-O-methyl-Cytidin (Cm) oder 2'-O-methyl-Ribothymidin (Tm). Ferner wurde eine große Anzahl anderer, z.T. sehr komplizierter modifizierter Nukleoside gefunden, z.B. Dihydrouridin (D), Pseudouridin (Ø), 6-isopentenyl-Adenosin (i^6A) und die Modifikation Q (7-(4,5-cis-Di-

Abb. 1: Einheitliche Zählweise für die Nukleoside in den Transfer-Ribonukleinsäuren



(Gitter et al., 1971)

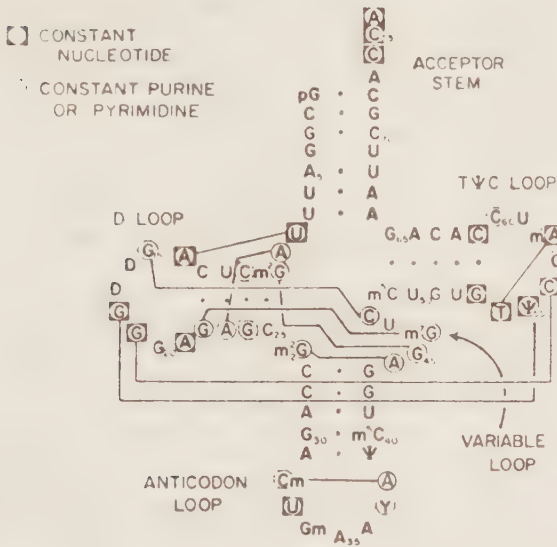
hydroxy-1cyclopenten-3-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosin). Die Strukturen einiger Modifikationen sind in Abb. 3. zusammengestellt.

Synthetisiert werden modifizierte Nukleoside entweder während beziehungsweise unmittelbar nach der Transkription der t-RNA Gene auf der Stufe der hochmolekularen Vorstufen oder nach dem 'Processing' in die fertig geschnittenen t-RNA Moleküle.

Bei der Einführung von Methylgruppen wird als Cosubstrat für die t-RNA Methyltransferasen hauptsächlich S-Adenosyl-Methionin verwendet. In grampositiven Organismen wird für die Biosynthese von 5-methyl-Uracil (m^5U) 54,

Abb. 2: Sekundär- und Tertiärstruktur der t-RNA^{Phe} aus Hefe (Rich und Rajbhandary, 1976, Kim, 1978)

RICH & RAJBHANDARY (1976)



The nucleotide sequence of yeast tRNA^{Phe} (41). Tertiary base-base hydrogen-bonding interactions are shown by solid lines, which indicate one, two, or three hydrogen bonds (2, 129, 137). The invariant and semi-invariant positions are indicated by solid and dashed boxes around the bases. Y₃₇ is a hypermodified base.

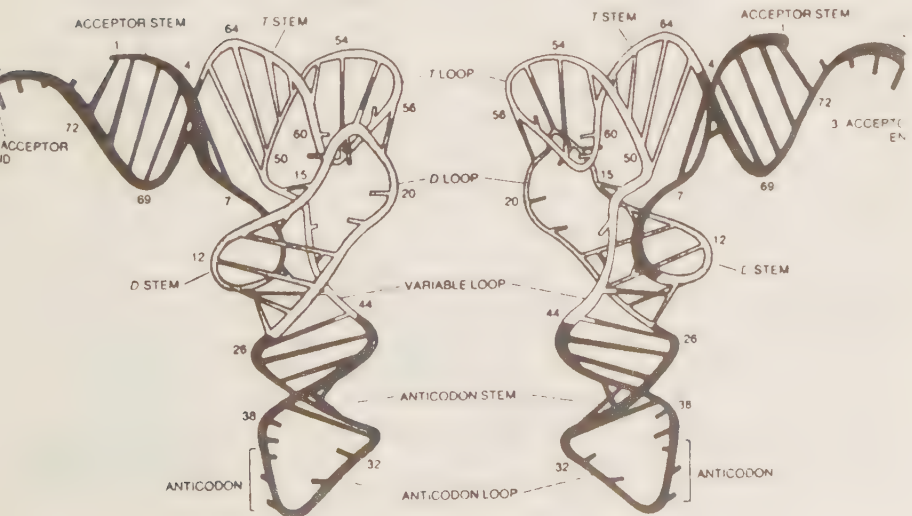
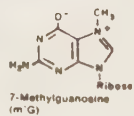
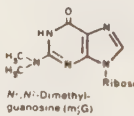
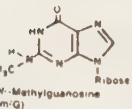
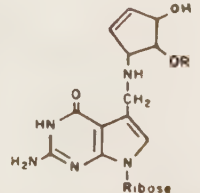
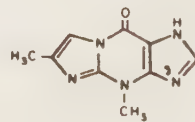
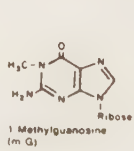
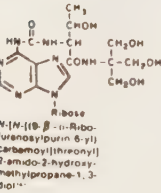
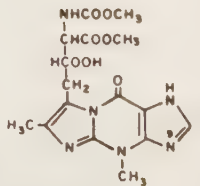
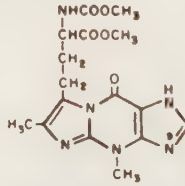
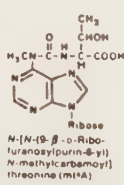
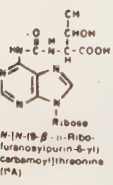
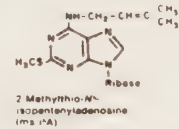
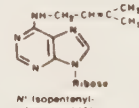
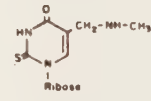
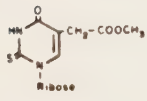
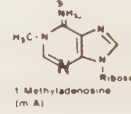
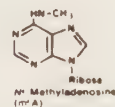
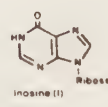
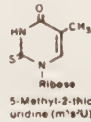
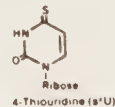
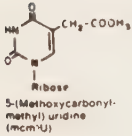
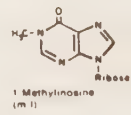
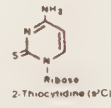
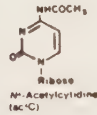
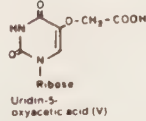
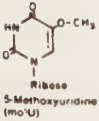
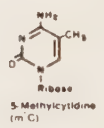
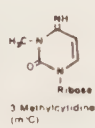
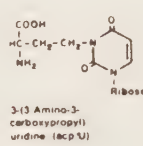
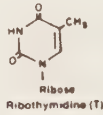
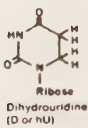
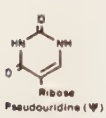


Abb. 3: Basen-modifizierte Nucleoside, die in Transfer-RNA vorkommen (Nishimura, 1978)

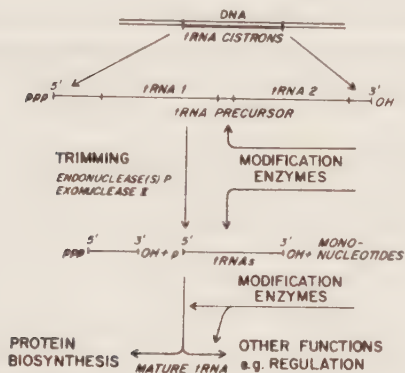


Base 'Y' (W)

R = H C Q (queuosine or Quo¹⁶²)
R = β-D-mannosyl: manQ¹⁶³
R = β-D-galactosyl: galQ¹⁶³

die Tetrahydrofolsäure als Cosubstrat verwendet (Schmidt et al., 1976). Einige Modifikationsreaktionen an der t-RNA verbrauchen ATP, andere verlaufen ohne Zufuhr von Energie.

Abb. 4: Schematische Darstellung der Transkription und des Processings der Transfer-Ribonukleinsäuren.



Kommt die gleiche Modifikation an mehreren Positionen in der t-RNA vor, so sind daran verschiedene Enzyme beteiligt, z.B. bei der Synthese von Pseudouridin 38 und Pseudouridin 55 in der t-RNA^{His} von *Salmonella* (Allandeen et al., 1972).

Die Anzahl der modifizierten Nukleoside in den t-RNAs nimmt zu, je weiter man auf der Evolutionsskala fortschreitet. In bakteriellen t-RNAs sind ca. 5%, in Säuger-t-RNAs ca. 20% der Nukleoside modifiziert. Bis heute sind nur wenige Funktionen modifizierter Nukleoside bekannt.

Die Hypermodifikation 6-isopentenyl-Adenosin neben dem 3'-Ende des Antikodons kommt in den t-RNAs vor, die ein Kodon beginnend mit einem Uridin erkennen.

Das 6-threonyl-Adenosin findet sich an der gleichen Stelle in solchen t-RNAs, die Kodons beginnend mit einem Adenosin erkennen (Roberts et al., 1974).

Nach der Wobbel-Hypothese von Crick (1966) können bestimmte Basen des 3'-Endes des Kodons mit Basen des 5'-Endes des Antikodons der t-RNA basenpaaren, die abweichen von der normalen A-U bzw. G-C Bindung.

Abb.5: Basenpaarung zwischen der 5'-Base des Antikodons und der 3'-Base des Kodons, die nach der Wobbel-Hypothese erlaubt sind.

5'-Anticodon base	3'-Codon base
G	U or C
C	G
A	U
U	A or G
I	A, U, or C

Das 2-Thio-Uracil in der ersten Position im Antikodon scheint das Wobbel-Verhalten von Uridin dahingehend einzuschränken, daß das modifizierte Uridin nur noch ein Adenosin erkennt, während ein unmodifiziertes Uridin nach der Wobbel-Hypothese sowohl Adenosin als auch Guanosin erkennen kann (Yoshida et al., 1970).

Das 2-Methyl-Guanosin an der Position 10 in t-RNA^{Phe} beeinflußt die Geschwindigkeit der enzymatischen Aminoacylierung. Die t-RNA^{Phe} aus *E. coli*, die an dieser Position ein unmodifiziertes Guanosin enthält, wird in vitro mit einer 10 fach geringeren Maximalgeschwindigkeit aminoacyliert als t-RNA^{Phe} aus Hefe, die an der Position 10 das 2-methyl-Guanosin enthält (Roe et al., 1973).

Es wird vermutet, daß 2'-O-Methylierungen die t-RNA gegen Ribonukleasen schützen (Agris et al., 1973)

Eine Mutante von Salmonella, die sog. His T Mutante, besitzt eine defekte Pseudouridinsynthetase (Singer et al., 1972). Dadurch enthalten die t-RNA^{His}, t-RNA^{Leu}, t-RNA^{Val} und andere t-RNAs dieser Mutante im Antikodonsstamm ein unmodifiziertes Uridin, während die Wildtyp-t-RNAs an dieser Stelle ein Pseudouridin besitzen. Während in den Zellen der Mutante die Proteinbiosynthese wie im Wildtyp verläuft, ist die Regulation der Aminosäureoperons dahingehend aufgehoben, daß auch bei genügendem Angebot der Aminosäuren His, Leu, Ile und Val die Operons dieser Aminosäuren in den Mutanten dereprimiert sind.

Der Gehalt an modifizierten Nukleosiden in der t-RNA ist für einen Organismus keine konstante Größe. Er kann verschieden sein in verschiedenen Zelltypen eines Organismus und sich ändern, wenn sich die Wachstumsbedingungen ändern.

Die Hypermodifikation des Deazaguanosinderivats Q, die in der ersten Position des Antikodons einiger t-RNA-Spezies vorhanden ist, ist in letzter Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Der Gehalt von Q relativ zu unmodifiziertem Guanodin ändert sich in den t-RNAs für Tyrosin, Histidin, Asparagin und Asparaginsäure während verschiedener Stadien im Lebenszyklus von Drosophila (White et al., 1973). Dies läßt vermuten, daß die Modifikation Q in einem Zusammenhang mit der Differenzierung steht. Drastische Unterschiede im Q-Gehalt bestimmter t-RNAs wurden auch in einer großen Zahl von Tumoren (Briscoe et al., 1975) und in Zellen gefunden, die unter verschiedenen Bedingungen gezüchtet wurden (Katze et al., 1975).

Eine sehr interessante Region in der t-RNA ist die Schleife 4 (Abb. 1). Sie enthält in Prokaryonten die konstante Sequenz 'G T ∇ C Purin'. Von Björk wurde eine Mutante von E. coli isoliert, in der das Ribothymidin (m⁵U) an der Position 54 durch ein Uridin ersetzt ist (Björk et al., 1971). In einer Mischpopulation des Wildtyps mit

der Mutanten überwächst der Wildtyp die Mutante nach ca. 20 Generationen; dies deutet darauf hin, daß zumindest für Prokaryonten ein Ribothymidin an der Position 54 in der t-RNA von Vorteil ist gegenüber einem Uridin-Rest an der gleichen Position.

Es gibt experimentelle Hinweise, daß die Sequenz G T $\emptyset$ C an eine komplementäre Basenfolge in der 5S r-RNA bindet (Ofengand et al., 1969). In unserem Arbeitskreis hat M. Albani mit spezifischen t-RNAs aus dem Elternstamm (mit rT 54) und t-RNAs aus der Mutante (mit U 54) gezeigt, daß die t-RNAs mit einem rT 54 fester in die ribosomale A-Seite binden als die t-RNAs mit einem Uridin 54. In Eukaryonten ist diese Sequenz in zahlreichen t-RNAs konserviert. Es kommen jedoch auch t-RNAs mit anderen Modifikationen in dieser Region vor. Roe klassifizierte eukaryontische t-RNAs bezüglich der Base an der Position 54 wie folgt:

Klasse	Nukleosid an der Position 54
A	A (eukaryontische Initiator t-RNAs)
B	rT $\emptyset$ Tm
C	zum Teil rT, zum Teil U
D	U (Roe et al., 1977)

Eukaryonten bieten daher zum Studium der Funktion des Ribothymidins in der t-RNA den Vorteil, daß hier in einer Zelle in der t-RNA an der Position 54 neben dem Ribothymidin auch andere Basen vorkommen. Darüberhinaus enthalten die t-RNAs, die zur Klasse C gehören, in einer Molekülspezies an der Position 54 zu einem Teil sowohl Ribothymidin als auch Uridin.

In der vorliegenden Arbeit wurden die t-RNAs des Schleimpilzes *Dictyostelium Discoideum* untersucht. Dieser Schleimpilz wächst in der Natur und im Laboratorium in einem

komplexen Medium. Unter Mangelbedingungen durchläuft er einen Entwicklungszyklus und bildet schließlich einen Fruchtkörper, bestehend aus Sporen- und Stielzellen. Folgende Fragen sollten untersucht werden:

- i) Welche modifizierten Nukleoside sind in der t-RNA von *D. Discoideum* enthalten und ändert sich dieses Modifikationsmuster während des Lebenszyklus?
- ii) Ist die t-RNA in irgendeiner Weise an der Regulation der physiologischen Prozesse in *D. Discoideum* beteiligt?

Der Schleimpilz ist ein ausgezeichnetes einfaches Modellsystem, um im Laboratorium biochemische Veränderungen im Verlauf von Entwicklungsprozessen zu studieren. Im folgenden sind daher einige bekannte morphologische, genetische und biochemische Merkmale dieses Organismus beschrieben.

Dictyostelium Discoideum ist ein Schleimpilz und gehört zur Klasse der Acrasieae. 1935 wurde er von Raper in den Wäldern North Carolina's entdeckt (Raper, 1935) und kann heute in ähnlichen Biotopen auf der ganzen Welt gefunden werden. Mehrere Eigenschaften machen ihn interessant für zellbiologische- und biochemische Forschungen. *D. Discoideum* wird in vielen Laboratorien als Modell zur Klärung verschiedener biologischer Probleme verwendet.

So bietet *D. Discoideum* als einfacher Eukaryont, der verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen kann, Möglichkeiten zum Studium von Entwicklungsvorgängen.

Als eukaryontischer Protist läßt er sich leicht züchten, entweder axenisch oder assoziiert mit Bakterien. In relativ kurzer Zeit werden genügend Zellen erhalten, um molekularbiologisch zu arbeiten.

Isolierte Zellen lassen sich mit nahezu 100%iger Ausbeute klonen.

Das Kerngenom besitzt nur etwa ein Fünfzigstel der Größe eines Säugergenoms und ist nur etwa elfmal größer als das Genom von *E. coli*.

Die üblichen *D. Discoideum* Stämme sind haploid; unschwer lassen sich Mutanten züchten, die defekt sind in bestimmten Funktionen des Wachstums und der Entwicklung.

Selten durchlaufen einzelne Zellen einen sexuellen Zyklus. Dabei fusionieren zwei Zellen und bilden eine Cyste mit dem diploiden Chromosomensatz. Nach mitotischer Teilung entstehen wieder haploide Tochterzellen.

Struktur und Expression des Genoms

Axenisch wachsende Zellen von *D. Discoideum* enthalten etwa 10^{-3} g DNA. Ca 28% dieser DNA finden sich in den Mitochondrien und bandieren im CsCl-Gradienten bei einer Dichte von 1,682 g/ccm, entsprechend einem G/C Gehalt von 28%. Das Kerngenom hat eine Molmasse von ca. $3,6 \times 10^{10}$, entsprechend 5×10^7 Nukleotidpaaren. Die Kern-DNA von *D. Discoideum* bandiert im CsCl-Gradienten bei 1,676 g/ccm, was einem G/C Gehalt von 23% entspricht. Die Mengen an DNA, RNA und Protein verhalten sich im Kern wie 1,0:3,4:2,2.

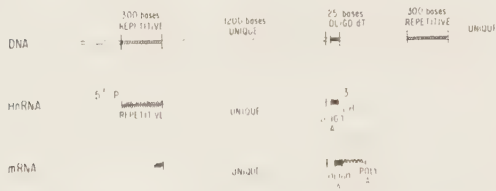
2,2% des Genoms kodieren die Sequenzen der 27S und 17S r-RNA, und von jeder dieser ribosomalen rRNA-Gene finden sich etwa 150 Kopien in der Zelle.

Die DNA von *D. Discoideum* enthält poly-dT-Sequenzen in einer Länge von etwa 25 Basen, jedoch kaum längere. Diese Sequenzen werden transkribiert, sind jedoch nicht die Matrizen der für m-RNA typischen poly-A-Sequenzen. Diese werden nach der Transkription an das 3'-Ende der m-RNA ansynthetisiert und enthalten etwa 100-150 Adeninreste, getrennt nur durch etwa 10 Basen von der 25 Basen langen poly-A-Sequenz.

Das Processing der m-RNA scheint in *Dictyostelium* einfacher zu sein als in Säugerzellen. Die Vorläufer-RNA ist im Kern nur wenig größer als die cytoplasmatische m-RNA. Lodish entwickelte auf Grund der vorliegenden experimentellen Daten ein Modell zur Struktur und Transkription der Kern DNA von *D. Discoideum*. (Abb. 6).

Etwa 8% der m-RNA, synthetisiert entweder in wachsenden Zellen oder in Zellen während der Entwicklung, sind komplementär zu den repetitiven DNA-Sequenzen. Da der größte Teil der repetitiven DNA-Sequenzen in der pre-m-RNA, nicht jedoch in der reifen m-RNA gefunden wird, spekuliert man, daß durch diese Sequenzen die Transkription reguliert wird.

Abb. 6: Modell zur Struktur und Transkription der Kern DNA von *D. Discoideum* (Kirtel & Lodish, 1973).



Eine repetitive Sequenz von etwa 300 Basen findet sich vor dem ca. 1200 Basen langen Strukturgen. Das gesamte Gen wird zunächst zur Vorläufer-RNA (Hn-RNA) transkribiert. Während des Processings wird dann ein Teil der repetitiven Sequenz abgeschnitten. Am anderen Ende des Gens befindet sich eine 25 Basen lange poly-dT-Sequenz, die zu oligo-A transkribiert wird. Wahrscheinlich enthalten alle Gene diese oligo-dT-Sequenz. Posttranskriptionell wird dann die für m-RNA typische poly-A-Sequenz ansynthetisiert.

Es wurden etwa 200 Familien dieser repetitiven Sequenzen gefunden.

Drei RNA-Polymerasen gibt es in *D. Discoideum*. Zwei von ihnen, eine α -Amanitin-resistente und eine α -Amanitin sensitive dienen zur Synthese der m-RNA, während die dritte, sie ist α -Amanitin-resistent, die r-RNA synthetisiert (Yaguara et al., 1976).

Der Lebenszyklus

In Abb. 7 ist der Lebenszyklus von *D. Discoideum* schematisch abgebildet. Die einzelnen Stadien dieses Zyklus sind willkürliche, wenn auch genau definierte Momentaufnahmen eines kontinuierlich ablaufenden Systems. Dieser genau definierte Lebenszyklus macht *D. Discoideum* zu einem hervorragenden System zum Studium von Regulationsvorgängen im Verlauf des Übergangs von einem Entwicklungsstadium in ein anderes.

Vegetatives Wachstum

In der vegetativen Phase wachsen die Amöben einzellig und vermehren sich durch Teilung mit einer Generationszeit von 3-10 Stunden. Die Generationszeiten hängen ab vom Stamm und von den Züchtungsbedingungen.

Der Wildtyp des Schleimpilzes wurde auf Agar Platten in Assoziation mit Bakterien, hauptsächlich *A. Aerogenes* oder *E. coli*, gezüchtet. Heute werden jedoch meistens sog. axenische Stämme verwendet, die in Flüssigkulturen gezüchtet werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden beispielsweise mit dem axenischen Stamm AX-2 durchgeführt (Watts & Ashworth, 1970). Dieser wird in dem recht billigen Medium HL 5 gezüchtet, das aus Hefeextrakt, Bactopecton, Maltose und Phosphatpuffer pH 6,7 besteht. Kürzlich wurden auch mehrere definierte Medien beschrieben, die es ermöglichen, auxotrophe Mutanten zu isolieren (Franke & Kessin, 1977, Rahmsdorf, 1977, Watts, 1977).

Bei verschiedenen Stämmen und verschiedenen Zuchtbedingungen variiert nicht nur die Generationszeit, sondern es können auch erhebliche Schwankungen in der Zusammensetzung der Biomoleküle auftreten.

Abb. 7: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Dictyostelium Discoideum

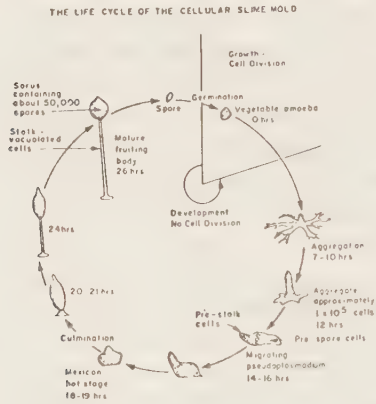
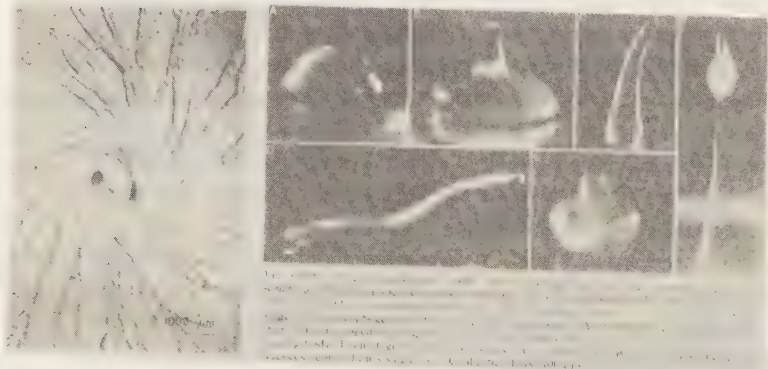


Abb. 8: Morphologische Änderungen während des Lebenszyklus von Dictyostelium Discoideum



Der axenische Stamm AX-2 wächst in der Flüssigkultur im HL 5 Medium bei ausreichender Belüftung logarithmisch mit einer Generationszeit von 8-10 Stunden bis zu einer Zelldichte von etwa 5×10^6 Zellen/ml. Danach geht er langsam in die stationäre Phase über und kann bei stark verzögerter Generationszeit bis zu einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml gezüchtet werden.

Es wurden temperatursensitive Stämme von *D. discoideum* isoliert, die bei 22°C gut wachsen, jedoch bei 27°C in der G₂-Phase des Zellzyklus auflaufen. Diese Mutanten ermöglichen es, auch mit Dictyostelium in synchron wachsenden Zellkulturen zu arbeiten (Katz & Bourguignon, 1974). Auf festem Untergrund können sich die Zellen amöboid bewegen. In diesem Stadium sind 30% des Gesamtproteins Actin und Myosin. Die makromolare Zusammensetzung in vegetativen AX-2 Zellen ist wie folgt (Ashworth & Watts, 1970):

Protein	11 mg/10 ⁸ Zellen
RNA	328 ug Ribose/10 ⁸ Zellen
DNA	22 ug/10 ⁸ Zellen
Kohlenhydrate	2,15 ug/10 ⁸ Zellen

Die Ribosomen sind etwas kleiner als Säugerribosomen und bestehen aus einer 27S-, einer 5,8S- und einer 5S-rRNA in der großen Untereinheit und einer 17S rRNA in der kleinen Untereinheit (Ceccarini & Maggio, 1968). Der gemeinsame Vorläufer von 27S-, 17S- und 5,8S rRNA ist eine 36S RNA.

Entwicklungsstadium

Die Entwicklung wird durch einen Hungerzustand ausgelöst. Amöben, die in Association mit Bakterien gezüchtet wurden, beginnen einen Entwicklungszyklus, wenn die bakterielle Nahrung erschöpft ist. Eine synchrone Entwicklung kann dadurch erreicht werden, daß die Nahrung (entweder das axenische Medium oder die Bakterien) abzentrifugiert wird, und die Zellen in einer Lösung, die nur anorganisches Salz enthält, resuspendiert werden. Diese Zellsuspension wird dann auf Filter oder Agar verteilt. Nach einer Interphase von 6-7 Stunden strömen die Zellen allmählich aufeinander zu und bilden Aggregate von etwa 10^5 Zellen. Diese Zellaggregation ist eine chemotaktische Antwort auf zyklisches AMP (Bonner, 1969). Es werden Substanzen gebildet, die entweder ausgeschieden werden oder an der Zelloberfläche haften, welche zyklisches AMP binden bzw. abbauen, und es treten Oberflächenproteine auf, die die Adhäsion der Zellen ermöglichen.

Die Aggregate bilden dann allmählich Pseudoplasmodien. Diese Pseudoplasmodien ("Slugs") wandern auf dem Untergrund, thermotaktisch oder chemotaktisch gereizt. Während bis dort die Zellpopulation einheitlich war, können ab diesem Stadium Unterschiede im Zellcharakter festgestellt werden. Die letzten zwei Drittel des Slugs bestehen aus Vorläuferzellen der Sporen mit einem charakteristischen Vesikel, während das vordere Drittel sich zu Stielzellen entwickelt. Die Spitze des Pseudoplasmodiums fungiert als embryonaler Organisator und ist essentiell für die weitere Entwicklung. Eventuell ist er verantwortlich für die ständige Sekretion von zyklischem AMP (Durstion, 1974). Während der gesamten Entwicklung fusionieren die Zellen nicht, und sie können jederzeit wieder mechanisch getrennt werden.

Nach 6-7 Stunden benötigen die Zellen, um weiter im Entwicklungszyklus fortschreiten zu können, einen festen Untergrund. Ist dieser nicht vorhanden, so verharret der

Organismus an diesem Punkt des Entwicklungszyklus. So ist es sehr leicht möglich, dieses sehr frühe Entwicklungsstadium, auch "Preaggregationsstadium" genannt, definiert zu untersuchen.

Bis zu einem gewissen Maße sind die Entwicklungsprozesse reversibel. Mechanisch getrennte Zellen wachsen in Medium nach einer lag-Phase wieder an.

Dem Pseudoplasmodienstadium folgt das Kulminationsstadium, etwa 16-19 Stunden nach Beginn der Entwicklung. Dieses Stadium ist charakterisiert durch ein Aufrichten des Pseudoplasmodiums, wobei sich die Vorläufer der Stielzellen in der Mitte des Aggregates befinden. Sie entwickeln sich weiter zu vakuolisierten Stielzellen. Die Vorläufer der Sporenzellen bilden schließlich Sporen, die sich in einem Sporangium an der Spitze eines Stengels befinden, der aus toten Stielzellen besteht.

Neben diesen morphologischen Änderungen äußert sich der Entwicklungsprozeß auch in erheblichen Unterschieden in der molekularen Zusammensetzung der Zellen zu verschiedenen Stadien.

Für den Dictyostelium Stamm NC 4, der in Assoziation mit Bakterien wächst, seien hier einige Beispiele gegeben (White & Sussman, 1961, Sussman & Sussman, 1969, Leach & Ashworth, 1972).

	Amoebae	Fructing bodies
Dry weight (mg 10^8 cells)	5.8	2.4
Protein (mg 10^8 cells)	2.5	1.5
RNA (mg 10^8 cells)	1	0.4
Total carbohydrate (mg 10^8 cells)	0.5	0.4
Cellulose (mg 10^8 cells)	0	0.1
Mucopolysaccharide (mg 10^8 cells)	0	0.08
Trehalose (mg 10^8 cells)	0	0.15
DNA (mg 10^8 cells)	36	30

Einer der ersten Effekte zu Beginn der Entwicklung ist der Zerfall von Polysomen. Während in vegetativen Zellen 90% der m-RNA und 90% der Ribosomen in der Polysomenfraktion gefunden werden, liegen schon 10 Minuten nach

Einsetzen der Entwicklung 60% der Ribosomen als Monosomen vor, während die restlichen Polysomen kleiner sind als im vegetativen Stadium (Lodish et al., 1976). Lodish erklärt diesen Effekt als eine verminderte Initiation der Proteinbiosynthese (Alton & Lodish, 1977). Erstaunlich ist es, daß auch jetzt weiter r-RNA synthetisiert wird, obwohl durch den Zerfall der Polysomen genügend Ribosomen zur Verfügung stehen. Vermutungen, die während der Entwicklung neu synthetisierten Ribosomen könnten sich unterscheiden von Ribosomen aus der vegetativen Phase, konnten nicht bestätigt werden. Beginnt *D. Discoideum* sich zu entwickeln, stellt er sehr bald die DNA-Synthese ein; ja es scheint sogar zu einem geringen Verlust von DNA zu kommen, der vielleicht auf eine Abnahme von Mitochondrien zurückzuführen ist.

Die Zelldifferenzierung geschieht aus der G_2 -Phase des Zellzyklus heraus. So durchlaufen Zellen, die z.B. während der Mitose abzentrifugiert und in Puffer suspendiert wurden, alle Phasen des Zellzyklus bis zur G_2 -Phase und treten dann in die Entwicklung ein. Die meisten Säuger differenzieren aus der G_1 -Phase heraus.

Während der Entwicklungsstadien ernährt sich der Organismus aus endogenen Reserven, was zum Teil den hohen Umsatz an Protein und RNA während dieser Zeit erklärt. Der größte Teil der benötigten Energie scheint durch den Verlust an Protein und damit durch Aminosäurekatabolismus gedeckt zu werden.

Zu verschiedenen Phasen der Entwicklung werden verschiedene Gene des *Dictyostelium*-Genoms exprimiert. So werden zu verschiedenen Stadien ganz bestimmte Enzyme synthetisiert, die als Marker dieser Stadien dienen können. Abb. 9 zeigt die Zeit des Auftretens von 13 solcher Enzyme während des Entwicklungszyklus. Die Enzyme 1, 2, 6 und 7 sind typische aminosäurekatabole Enzyme.

Abb. 9: Stadiumspezifische Enzyme in Dictyostelium
Discoideum

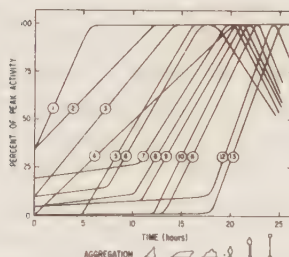


Fig. 9.1. Stage-specific enzymes of *D. discoideum*. Development was initiated by depositing bacterially grown amoebae on filter supports. Samples were taken and the specific activities of the following enzymes were determined

Code	Enzyme	Abbreviation
1	Alanine transaminase	AT
2	Leucine aminopeptidase	LAP
3	N-Acetylglucosaminidase	NAG
4	α -Mannosidase	MAN
5	Trehalose-phosphate synthetase	TPS
6	Threonine deaminase-2	TD
7	Tyrosine transaminase	TT
8	UDPG pyrophosphorylase	PP _{ase}
9	UDPGal polysaccharide transferase	Trans
10	UDPG epimerase	EPI
11	Glycogen phosphorylase	GP
12	Alkaline phosphatase	Alk P
13	β -Glucosidase-2	BG-2

Das Agens, das die Zellen zu Beginn der Entwicklung chemotaktisch anlockt, ist zyklisches AMP. Aggregationskompetente Zellen reagieren auf zyklisches AMP, indem sie sich zu höheren Konzentrationen dieses Nukleotids hinbewegen. Die Konzentration von zyklischem AMP steigt deutlich an während der ersten Stadien der Entwicklung zu Sporen, vermutlich durch das Auftreten eines Inhibitors des Enzyms, das zyklisches AMP abbaut (c-AMP-Phosphodiesterase). Die Aktivität der Adenylatcyclase bleibt während des ganzen Lebenszyklus relativ konstant

(Rossomando & Sussman, 1972). Der Inhibitor der c-AMP-Phosphodiesterase wurde isoliert und zeigt seine Aktivität auch *in vitro*. Verschiedene aggregationslose Mutanten (agg^-) sind nicht in der Lage, diesen Inhibitor zu synthetisieren.

Neben der extrazellulären c-AMP-Phosphodiesterase erscheint während der Preaggregation noch eine membran-gebundene Phosphodiesterase an der Oberfläche, die gegen den Inhibitor resistent ist (Malchow et al., 1972). Sie scheint c-AMP zu binden und für die Bewegung der Zellen zu höheren c-AMP Konzentrationen hin verantwortlich zu sein.

Während der frühen Entwicklungsphase tauchen Oberflächenproteine auf, die für die Zellkohäsion verantwortlich sind. Diese Kohäsion ist EDTA-resistent, d.h. bivalente Kationen scheinen nicht essentiell zu sein für die Haftung der Zellen untereinander.

Zu dieser Zeit wird ein neues Oberflächenprotein synthetisiert, das von Beug et al. (1973) "A-Antigen" genannt wurde. Sowohl die Fähigkeit, EDTA-resistente Aggregate zu bilden, als auch das Vorhandensein des A-Antigens, wurden bei einer agg^- Mutanten nicht gefunden. Ihre Revertante besaß beide Eigenschaften wieder. Ein anderes Oberflächenprotein, das "B-Antigen" findet sich sowohl in wachsenden- wie in Zellen während der Entwicklung. Obwohl es auch in vegetativen Zellen vorkommt, verhindern Antikörper gegen dieses Protein die Zellaggregation.

Daß an der Oberfläche der Amöben dramatische Veränderungen stattfinden, deuten auch die Reaktionen mit Concanavalin A an; um Präaggregationszellen mit Concanavalin A zu agglutinieren, bedarf es weit höherer Konzentrationen als bei vegetativen Zellen (Weeks, 1973).

Nach etwa 12 Stunden erreicht der Entwicklungszyklus das Pseudoplasmodienstadium. Dieses Pseudoplasmodium ist umgeben von einer Scheide, die kürzlich von Freeze und Loomis gut untersucht wurde (Freeze & Loomis, 1977).

Sie besteht zu 60% aus Zellulose, zu 15% aus Protein, zu 3% aus Heteropolysacchariden, zu 5% aus Lipid und zu 1% aus Sulfat. Interessant ist, daß in dem Protein signifikant die Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure, Serin, Threonin und Cystein vermehrt vorkommen, während nur wenig Glutamin, Glutaminsäure, Alanin, Lysin, Tyrosin, Phenylalanin und Arginin vorhanden sind. Außerdem scheinen die Proteine relativ geringe Molekulargewichte zu besitzen. Die Scheide ist vorne am Pseudoplasmodium am dünnsten, während sie hinten viel dicker ist. Während der Wanderung des "Slugs" bleibt die Scheide hinten zurück.

Während die Bewegung der Preaggregationszellen chemotaktisch gesteuert wurde, wird sie im Pseudoplasmodium durch Licht, Wärme oder Feuchtigkeit ausgelöst. In diesem Stadium lassen sich die Zellen des vorderen Drittels als Vorläufer der Stielzellen, die der zwei hinteren Drittel als Vorläufer der Sporen erkennen. Daß jedoch auch in diesem Stadium die Zellen nicht endgültig determiniert sind, zeigt sich darin, daß ein durchschnittenes Pseudoplasmodium durchaus in der Lage ist, zwei komplette Fruchtkörper zu bilden.

Es scheint so, als gingen von der Spitze des Pseudoplasmodiums Signale aus, die einmal die eindeutige Polarität bestimmen und zum anderen verhindern, daß an anderer Stelle zusätzliche Spitzen entstehen. Konzentrationsbestimmungen am "Slug" zeigen, daß die c-AMP-Menge an der Spitze größer ist, als am Ende. Durch Behandlung mit c-AMP läßt sich die Bildung stielähnlicher Zellen induzieren.

Die Vorläuferzellen des Stiels und der Sporen kann man in einem Dextrangradienten trennen, wobei die Vorläufer der Sporen bei einer geringeren Dichte bandieren, als die Vorläufer der Stielzellen. (Takeuchi, 1969). Die leichten Zellen bilden schneller Aggregate und Pseudoplasmodien als die schweren Zellen; sie enthalten doppelt soviel Ca^{2+} und zehnmal soviel c-AMP und reagieren sehr viel stärker auf c-AMP als die schweren Zellen.

Auskeimen der Sporen

Der erste erkennbare Effekt beim Auskeimen ist das Schwellen der Sporen. Danach brechen zwei der drei Wände entlang der Längsachse der Sporen auf. Schließlich zerbricht auch die letzte Wand und entläßt eine einzelne vegetative Zelle.

Eine Anzahl von Faktoren beeinflussen das Auskeimen der Sporen. In Phosphatpuffer keimen die Sporen nicht. Bei geringer Sporendichte benötigt das Auskeimen Feuchtigkeit und Sauerstoff, während bei großer Sporendichte ein Medium, entweder ein axenisches oder Bakterien vorhanden sein muß.

Keimende Sporen scheiden einen Inhibitor aus, der die Keimung verhindert. Dieser wurde kürzlich identifiziert und die Struktur geklärt (Hiroshi et al., 1976). Ein Gleichgewicht zwischen Inhibitor und keimungsfördernden Substanzen scheinen den Keimungsvorgang aufrecht zu halten.

Man kann die Sporen aktivieren durch Agentien, die normalerweise Proteine denaturieren, z.B. 8M Harnstoff, 20% DMSO oder dreißigminütiges Erhitzen auf 45°C. Cotter versucht diesen Effekt dadurch zu erklären, daß durch diese Behandlung Enzyme an der Innenmembran der Mitochondrien denaturiert werden, die die oxidative Phosphorylierung blockieren (Cotter & Raper, 1968).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden im "pro analysi" Reinheitsgrad von der Firma E. Merck, Darmstadt bezogen. Käufliche Nukleotide, Hemmstoffe und t-RNA aus E. coli und aus Bierhefe stammten von der Firma Boehringer, Mannheim.

Enzyme:

Boehringer, Mannheim:	RNAase A (=pankreatische RNAase)
	Polynukleotid Kinase
	Hexokinase aus Hefe
Calbiochem, San Diego, USA:	RNAase T ₂
Worthington, Freehold, USA:	RNAase T ₁
	alkalische Phosphatase aus E. coli
	Schlangengiftdiesterase
	Apyrase

Chromatographiematerialien:

Boehringer, Mannheim:	BD-Zellulose
Pharmacia, Uppsala, Schweden:	Sephadex (alle Typen)
Ugine Kuhlmann, Frankreich:	Resines Voltalef 300 LD-PL micro
Ashland Chemical Co., Columbus, Ohio, USA:	Adogen 464
Whatman, England:	DEAE Zellulose DE 32 und DE 52
	DE 81 Chromatographiepapier
Reicher und Schüll, Dassel:	Zelluloseacetat Elektrophoresefolie CA 250/0
Merck, Darmstadt:	Cellulose Dünnschichtplatten

Radioaktive Substanzen wurden bezogen von den Firmen:

The Radiochemical Centre, Amersham, Braunschweig

New England Nuclear, Boston USA

Commissariat a L'Energie Atomique, Frankreich

Die gewünschte spezifische Radioaktivität wurde durch Verdünnen mit den entsprechenden "kalten" Substanzen eingestellt.

3.1.2. Chromatographiezubehör

Die Säulenchromatographien wurden in Kühlmantelsäulen der Firma Labor-Center, Erlangen, durchgeführt.

Die Gradienten wurden mittels eines Heidolph-Gradientenmischers hergestellt und mit Perpex-Pumpen (LKB Producter AB, Bromma, Schweden) bei konstantem Durchfluß durch die Säule geleitet. Nicht lineare Gradienten wurden mittels eines LKB 11300 Ultrograd Gradientenmischers hergestellt.

Die Elution wurde über die UV-Absorption der Substanzen bei 254 nm mit Geräten der Firma LKB verfolgt. Die Fraktionen wurden mit einem Ultrorac-Fraktionssammler (LKB) gesammelt, der in einer Colora Kühltruhe aufgestellt war.

RPC-5 Chromatographie unter erhöhtem Druck wurde mit einer HPLC-Anlage der Firma Altex, Californien (Lieferfirma, Kontron, München) ausgeführt. Hierzu wurden selbstgefüllte RPC-5 Säulen (25 x 0,4 cm) verwendet.

3.1.3. UV-Spectralphotometer

Die Absorption von RNA-Lösungen wurde bei 260 nm in einem Zeiss-Photometer, PMQ III gemessen. Kontinuierliche Spektren wurden an einem Shimadzu, Double-Beam Spectralphotometer, UV-210A, aufgenommen.

3.1.4. Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität von Proben wurde in Tricarb-Flüssigkeitsszintillationszählern der Firma Packard (Modelle 3320, 3385 und 2660) gemessen. Die Szintillatoren PPO und Dimethyl-POPOP wurden von Zinsser, Frankfurt, geliefert.

Die Szintillatorlösungen hatten folgende Zusammensetzung:

i) Flüssige, wässrige Proben, Dioxanszintillator:

60 g Naphtalin, 20 ml Äthylenglykol, 100 ml Methanol, 4 g PPO, 0,2 g Dimethyl-POPOP und Dioxan ad 1000 ml.

ii) Feste Proben (Filterplättchen), Toluolszintillator:

5 g PPO und 0,3 g Dimethyl-POPOP in 1 l Toluol.

Für die Autoradiographien wurden Röntgenfilme der Firma Agfa, Osray T₄, verwendet. Fluorographien wurden mit dem Folienfilm von Kodak, RP X-Omat, durchgeführt. Vor der Fluorographie wurden die Chromatogramme mit einer Lösung von 7% PPO in Äther (w/w) übergossen.

3.1.5. Fließmittel

- A) Acetonitril : 4N NH₃ (3,4 : 1)
- B) t-Amylalkohol : Essigsäureäthylester : Acetonitril : Methyläthylketon : Ameisensäure : H₂O (4 : 2 : 1,5 : 2 : 0,18 : 1,5)
- C) i-Buttersäure : 0,5 N NH₃ (5 : 3)
- D) i-Propanol : konz. HCl : H₂O (7 : 1,5 : 1,5)
- E) n-Butanol : i-Buttersäure : konz. NH₃ : H₂O (75 : 37,5 : 2,5 : 25)
- F) ges. (NH₄)₂SO₄ : 0,1 M Na-acetatpuffer pH 6 : i-Propanol (79 : 19 : 2)
- G) i-Buttersäure : konz. NH₃ : H₂O (66 : 1 : 33)
- H) 0,1 M Na-phosphat pH 6,8 : (NH₄)₂SO₄ : n-Propanol (100 : 60 g : 2)

3.2. Zuchtbedingungen

3.2.1. Vegetatives Wachstum

Der axenisch wachsende Stamm des Schleimpilzes Dictyostelium Discoideum AX 2 wurde in folgendem von Watts und Ashworth (1970) beschriebenen Medium gezüchtet:

I.	Bactopepton	14,30 g
	Hefe Extrakt	7,15 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,64 g
	KH_2PO_4	0,48 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
II.	Maltose	18,00 g
	Aqua bidest.	ad 50 ml
	Streptomycin	0,25 gr

Die Lösungen I und II wurden in vorsterilisierten Erlenmeyerkolben zweimal 40 Minuten sterilisiert. Anschließend wurde das Streptomycin zu der Lösung II gegeben und diese unmittelbar vor dem Animpfen der Lösung I zugesetzt.

Die Züchtungen erfolgten in Erlenmeyerkolben zu 100 ml = 20 ml Medium, 1 l = 200 ml Medium und 2 l = 600-800 ml Medium. Sie wurden in einem New Brunswick Rotary Shaker bei 22°C und 180 Upm geschüttelt.

Züchtungen größerer Zellmengen erfolgten in einem Fermenter der Fa. Eschweiler, Kiel.

Der Wachstumsverlauf wurde durch Zählen der Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer verfolgt und in Zellen/ml Medium angegeben.

Zählt man alle 16 Quadrate der Kammer aus, so errechnet sich die Zellzahl nach:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen} \times 10^3}{3,2} = \text{Zellen/ml Medium}$$

Geerntet wurden die Zellen nach Erreichen der gewünschten Zellzahl durch Zentrifugation bei 4°C in einer Christ-Variofuge oder einer Beckmann L6 Zentrifuge bei $3000 \times g$. Fermenterzüchtungen wurden in einer Cepa Durchflußzentrifuge bei 4°C geerntet.

3.2.2. Entwicklung in Submerskulturen

Phosphatstammpuffer pH 6,0 (50 fach konzentriert):

KH_2PO_4	99,86 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	17,80 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die 1 : 50 verdünnte Stammlösung wurde in vorsterilisierten Erlenmeyerkolben zweimal 40 Minuten autoklaviert. Vegetative Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem Phosphatpuffer zu $8 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen/ml in Puffer suspendiert und bei 22°C geschüttelt. Geerntet wurden die Zellen analog den vegetativ gewachsenen Zellen.

3.2.3. Entwicklung auf Agar-Platten

Phosphat-Agar:

Agar-Agar	10 g
1 : 50 verdünnter	
Phosphat Stammpuffer	500 ml

Der Agar wurde in Phosphatpuffer gelöst, sterilisiert und anschließend auf sterile Petrischalen verteilt. Ca. 2×10^8 mit Phosphatpuffer gewaschene Zellen wurden in 0,5 ml Phosphatpuffer suspendiert und auf einer Agar-Platte verteilt, wo sie im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen wurden. Nach zwei Tagen konnten die Fruchtkör-

körper in 1,5 ml Medium als Stockröhrchen bei -80°C eingefroren oder zur Neuanzuchtung in 20 ml Kulturen angeimpft werden.

3.2.4. Züchtung in phosphatarmem Medium

Sollten Zellen während des Wachstums oder während der Entwicklung mit ^{32}P Phosphat markiert werden, so wurde der Organismus in einem phosphatarmen Medium gezüchtet.

I.	Hefe Extrakt	5 g
	Bactopepton	10 g
	7 mM MES-Puffer pH 6,8	ad 800 ml
II.	Glukose	10 g
	Aqua bidest.	ad 150 ml
	Streptomycin	0,25 g

Die Entwicklung erfolgte in folgendem Puffer:

KCl	1,49 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,23 g
7 mM MES-Puffer pH 6,5	ad 1000 ml

3.3. Präparation von Gesamt-t-RNA

Für die Präparation von Gesamt-t-RNA wurden je nach Menge der aufzuschließenden Zellen unterschiedliche Methoden angewendet. Ziel sollte es sein, in möglichst kurzer Zeit biologisch aktive t-RNA zu isolieren, die weitgehend frei sein sollte von niedermolekularen und hochmolekularen Verunreinigungen.

3.3.1. Präparation von t-RNA aus einer geringen Anzahl von Zellen (bis zu 10^{10} Zellen)

Pufferlösungen:

- I. 0,4 M Saccharose; 0,01 M Tris/HCl pH 7,5;
0,1 M KCl; 0,06 M $MgCl_2$; 0,03 M NaCl.
- II. 0,15 M NaCl; 0,01 M Tris/HCl pH 7,5;
0,001 M Na_2EDTA .
- III. 0,05 M NaCl; 0,01 M $MgCl_2$; 0,001 M Na_2EDTA .
- IV. 1 M NaCl; 0,01 M $MgCl_2$; 0,01 M Na_2EDTA .
- V. 0,01 M $MgCl_2$; 0,001 M Na_2EDTA .
- VI. 0,25 M NaCl; 0,01 M $MgCl_2$; 0,001 M Na_2EDTA .
- VII. 0,7 M NaCl; 0,01 M $MgCl_2$; 0,001 M Na_2EDTA .

Die gewaschenen Zellen wurden mit der dreifachen Menge Alkoa einige Minuten bei $4^{\circ}C$ im Mörser zerrieben, in 4 ml Puffer II und 20 ml Puffer I suspendiert und mit weiteren 20 ml Puffer I in Zentrifugengläser überführt. Es wurde 10 Minuten bei $12\ 000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand mit 50 ml einer 80%igen Phenollösung in Puffer II 30 Minuten bei $4^{\circ}C$ gerührt. Anschließend wurde bei $12\ 000 \times g$ 30 Minuten zentrifugiert und der wässrige Überstand mit 125 ml abs. Äthanol und 1,5 g K-acetat versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei $-20^{\circ}C$ belassen. Nach Zentrifugation (15 Minuten, $12\ 000 \times g$) wurde das Sediment mit 10 ml Puffer III gelöst, mit 2,5 ml einer 5 M NaCl-Lösung versetzt und 2 Stunden im Eis stehen gelassen. Dann wurde zentrifugiert und der Überstand gesondert aufgehoben. Das Sediment wurde mit 2,5 ml Puffer IV gewaschen und die Suspension erneut zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt, mit 50 ml Lösung V versetzt und auf eine 1×3 cm DEAE-Zellulosesäule aufgezogen. Diese war zuvor mit Puffer VI äquilibriert worden. Die t-RNA wurde mit Puffer VII eluiert und mit 2,5 Volumen abs. Äthanol über Nacht gefällt.

3.3.2. Präparation von t-RNA aus größeren Zellmengen (Fermenterzüchtungen)

Pufferlösungen:

- I. 0,01 M 0,01 M Tris/HCl pH 7,5; 0,01 M $MgCl_2$; 0,002 M $Na_2S_2O_3$.
- II. 0,1 M K-acetat pH 5,0.
- III. 0,3 M Na-acetat pH 7,0.

Die gewaschenen Zellen wurden in 2 ml Puffer I pro Gramm Feuchtgewicht suspendiert und mit dem gleichen Volumen einer 80%igen Phenollösung in Puffer I eine Stunde bei 4°C gerührt. Nach Zentrifugation wurde der wässrige Überstand mit 2,5 Volumen abs. Äthanol und 2% K-acetat versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Weiter Fermenterzüchtungen wurden auf diese Weise aufgearbeitet und als Äthanolfällung vereinigt bei -20°C belassen.

Das weitere Aufarbeitungsschema folgt der Arbeit von Rogg et al. (1969). Danach wird der Alkohol abzentrifugiert und das Sediment im Vakuum getrocknet. Dieses wird dann in 60 ml Puffer II pro Gramm Feuchtgewicht gelöst und das unlösliche Material durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wird mit 10 g DE 32 Zellulose, die zuvor mit Puffer II äquilibriert wurde, gerührt und anschließend auf einer Nutsche gesammelt. Man wäscht solange die Zellulose mit Puffer II, bis das Eluat auf Zusatz von 2 Volumen Äthanol nicht mehr getrübt wird. Anschließend wird nacheinander mit 0,1 M K-acetatlösung gewaschen, die 0,1 Mol NaCl, 0,2 Mol NaCl und 0,3 Mol NaCl je Liter enthalten. Schließlich wird die t-RNA mit 1 M NaCl in Puffer II abgelöst und mit 2 Volumen abs. Äthanol gefällt.

Zur Entfernung von DNA und r-RNA wird das Präzipitat mit 50 ml Puffer III pro Gramm Trockengewicht versetzt. Unter Rühren werden dann bei 20°C 0,54 Volumen Isopropanol zugetropft und der Niederschlag abzentrifugiert.

Der Überstand wird mit weiteren 0,44 Volumen Isopropanol versetzt. Dieses Präzipitat enthält die t-RNA. Es wird dreimal mit Äthanol und dreimal mit Äther gewaschen und in einem kleinen Volumen Wasser gelöst. Alle t-RNA Präparationen wurden bei -20°C in Wasser gelöst gelagert.

3.4. Reinheitsprüfung von t-RNA

Für die Basenanalyse nach Randerath mußte die t-RNA absolut rein sei, d.h. frei von anderen Ribonukleinsäuren. Dies wurde durch Gelchromatographie an Sephadex G 200 und durch präparative Polyacrylamidgel Elektrophorese erreicht.

3.4.1. Gelchromatographie von t-RNA an Sephadex G 200

Pufferlösung:

I. 0,2 M NaCl; 0,01 M MgCl_2 ; 0,01 M Tris/HCl pH 7,5.

Diese Art der Säulenchromatographie ermöglicht es, hoch- und niedermolekulare Verunreinigungen von der t-RNA zu entfernen, wobei die hochmolekularen Kontaminationen im Ausschlußvolumen der Säule eluieren, während die niedermolekularen Substanzen später als die t-RNA eluiert werden.

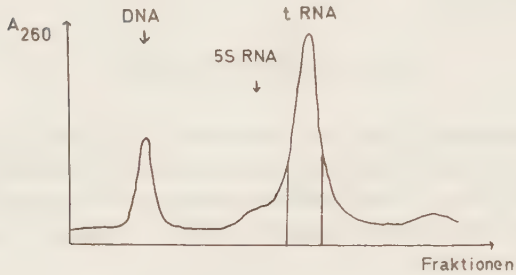
Sephadex G 200 Pulver wurde mit einem Überschuß an Puffer I versetzt, sterilisiert und einen Tag zur Quellung stehen gelassen.

Eine Säule von 1,5 cm Durchmesser wurde im Laufe eines Tages bis zu einer Höhe von 90 cm gefüllt und über Nacht mit Puffer I äquilibriert.

Es wurden 10-50 A_{260} t-RNA augetragen und hydrostatisch 4-7 Stunden eluiert.

Das Elutionsprofil einer solchen Säule ist in Abb. 10 dargestellt.

Abb. 10: Elutionsprofil einer Sephadex G 200
Chromatographie

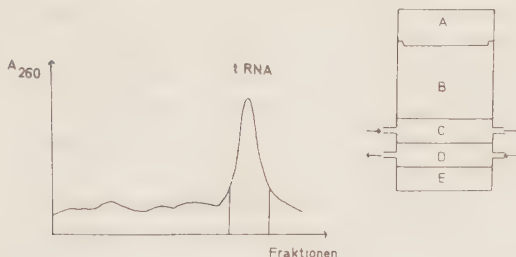


20 A_{260} wurden auf einer Sephadex G 200 Säule (90 x 1,5 cm) isokratisch mit Puffer I (0,2 M NaCl; 0,01 M $MgCl_2$; 0,01 M Tris/HCl pH 7,5) gereinigt.

3.4.2. Präparative Polyacrylamidgel Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde in 10%igen Polyacrylamid-Plattengelen ausgeführt. Die t-RNA wurde hier von 5S r-RNA und RNA Bruchstücken gereinigt, wobei sie durch das ganze Gel in Richtung Anode wandert und mit einem am Boden der Gelplatte vorbeiströmenden Puffer eluiert wird. Das Verfahren ist genau in der Dissertation von R. Böcker (1975) beschrieben. Abb. 11 zeigt eine Skizze der Versuchsanordnung mit einem Elutionsprofil einer t-RNA Präparation.

Abb. 11: Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese



5 A_{260} t-RNA wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel (B) aufgetragen und konstant bei 400 V von der Kathode (A) zur Anode (E) elektrophoretisiert. Die t-RNA wurde mit dem am Gelboden vorbeiströmenden Puffer (C) eluiert und anschließend fraktioniert. Die Pufferräume (C), (D) und (E) sind durch Dialysemembranen von einander getrennt.

3.5. Präparation t-RNA-freier ribosomaler RNA

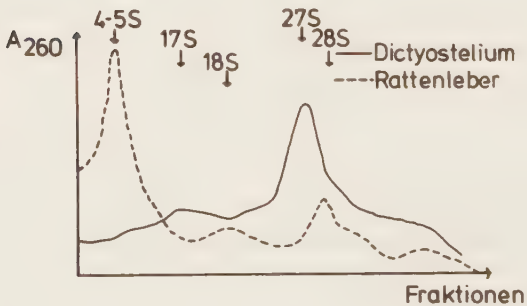
t-RNA freie ribosomale RNA diente als Carrier bei der Fällung geringster Mengen t-RNA. Sie wurde aus 80S Ribosomen isoliert, die als Sediment bei der Präparation von S-100 Enzymextrakten anfiel.

Pufferlösungen:

- I. 0,01 M Tris/HCl pH 7,8; 0,06 M KCl; 0,006 M β -ME;
0,03 M NH_4Cl ; 0,0003 M MgCl_2 .
- II. 0,15 M NaCl; 0,015 M Na-Citrat; 0,01 M EDTA
pH 7,0.
- III. 3 M Na-acetat pH 6,0

Das Sediment einer S-100 Präparation von Dictyostelium wurde in 1 ml Puffer I und 1 ml Puffer II suspendiert und mit 0,2 Volumen einer 10%igen Na-Dodecylsulfatlösung versetzt. Mit dem gleichen Volumen einer 80%igen Phenollösung wurde 30 Minuten gerührt und nach Zentrifugation die wässrige Phase mit 2,5 Volumen Äthanol versetzt. Der Niederschlag wurde dreimal mit 5 ml Puffer III homogenisiert und dann zentrifugiert. Danach wurde das Sediment mit Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Abwesenheit von t-RNA wurde in einem Gradientenzentrifugationslauf geprüft. Im gleichen Lauf wurde als Kontrolle eine Präparation von cytoplasmatischer RNA aus Rattenleber mitgeführt, die mir freundlicherweise St. Frank zur Verfügung stellte.

Abb. 12: Gradientenzentrifugation ribosomaler RNA aus Dictyostelium Discoideum (——) und cytoplasmatischer RNA aus Rattenleber (-----).



Die Ribonukleinsäuren wurden mit 105 000 x g 14 Stunden in einem Saccharosegradienten von 10%-30% bei 4°C zentrifugiert.

3.6. Präparation von Enzymextrakten

3.6.1. Präparation eines S 100 Überstandes aus Dictyostelium Discoideum

Pufferlösungen:

- I. 0,01 M Tris/HCl pH 7,5; 0,01 M $MgCl_2$; 10% Glycerin
0,014 M β -ME.
- II. 0,2 M KCl; 0,05 M Tris/HCl pH 7,5; 0,01 M $MgCl_2$
10% Glycerin; 0,014 M β -ME.

Fünf Gramm Zellen wurden nach Zentrifugation und Waschen in Phosphatpuffer mit 5 ml Puffer I im Mörser mit 15 gr Alkoa 3 Minuten zerrieben. Mit weiteren 15 ml Puffer I wurde die Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt und das Alkoa bei 12 000 x g 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde 30 Minuten bei 30 000 x g und danach 1 Stunde bei 105 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben, mit 1/4 seines Volumens an 1 M KCl versetzt und auf eine gekühlte DE 32 Zellulose-säule ($\emptyset$ 3,4 cm; Höhe 5 cm) aufgezogen. Diese war zuvor mit Puffer II äquilibriert worden. Während die RNA durch den Anionenaustauscher auf der Säule gehalten wurde, wurde das Protein mit Puffer II eluiert. Fraktionen, deren Quotient A_{260}/A_{280} kleiner als 1,2 (mehr als 95% Protein) war, wurden vereinigt und zu 85% mit $(NH_4)_2SO_4$ gesättigt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in wenig Puffer I suspendiert und dreimal gegen 200 Volumen Puffer I dialysiert.

Protein wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Meist wurden Werte zwischen 10 und 15 mg/ml erhalten. Die Extrakte wurden portioniert, in Stickstoff eingefroren und bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

3.6.2. Präparation eines S-30 Überstandes aus E. coli MRE 600

Hier wurde nach der von Reszelbach et al. (1977) beschriebenen Methode verfahren.

Pufferlösungen:

- I. 0,01 M Tris/HCl pH 7,5; 0,01 M $MgCl_2$;
0,01 M β -ME; 10% Glycerin.
- II. 0,2 M KCl; 0,01 M Tris/HCl pH 7,5; 0,01 M $MgCl_2$;
0,01 M β -ME; 10% Glycerin.
- III. 0,01 M Tris/HCl pH 7,5; 0,01 M β -ME; 10% Glycerin.

E. coli MRE 600 Zellen wurden mit der zweifachen Menge Alkoa einige Minuten bei 4°C im Mörser zerrieben. Dann wurde Puffer I zugegeben und mit der Alkoapaste homogenisiert. Das Alkoa wurde niedertourig abzentrifugiert und der Überstand anschließend einer 30 000 x g Zentrifugation unterworfen. Der Enzymextrakt wurde nun auf 0,2 M KCl eingestellt und auf eine DE 32 Säule gegeben, die zuvor mit Puffer II äquilibriert worden war. Das mit dem gleichen Puffer erhaltene Eluat wurde mit 50 g / 100 ml festem $(NH_4)_2SO_4$ versetzt und der Niederschlag in wenig Puffer III suspendiert. Anschließend wurde dreimal gegen 200 Volumen des gleichen Puffers dialysiert.

3.7. Aminoacylierung von t-RNA

Die Aminoacylierung von t-RNA aus Dictyostelium mit einem t-RNA freien S-100 Rohextrakt wurde nach Palatnik et al. (1977) durchgeführt. Alle Ansätze enthielten 0,1 M Na-cacodylat pH 7,5 und etwa 2 A₂₆₀ Gesamt-t-RNA. Die Konzentrationen an ATP, $MgCl_2$, Aminosäure und Rohextrakt sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die Ansätze wurden bei 22°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem ein Aliquot des Ansatzes auf ein

Whatman 3MM Filterplättchen ($\emptyset$ 25 mm) pipettiert wurde und dieses in eiskalte 10%ige TCA gegeben wurde. Die weitere Aufarbeitung war wie bei Schmidt (1977) beschrieben.

Tab. 2: Bedingungen zur Aminoacylierung von Gesamt-t-RNA aus Dictyostelium Discoideum

Aminosäure	ATP (mM)	MgCl ₂ (mM)	AS (μ M)	ug Enzym/ 100 ml	Reaktions- zeit (min)
Arginin	10	20	20	500	20
Asparagin	5	10	20	250	20
Asparaginsäure	5	10	10	500	10
Glutaminsäure	5	5	60	500	25
Glycin	5	10	20	50	20
Histidin	5	40	70	500	20
Isoleucin	0,625	10	30	500	30
Leucin	5	10	20	250	15
Lysin	2,5	5	50	100	10
Methionin	2,5	5	50	500	50
Phenylalanin	5	10	20	50	25
Prolin	5	10	70	250	20
Serin	10	20	40	500	10
Threonin	10	10	60	250	25
Tryptophan	2,5	5	60	500	30
Tyrosin	5	10	20	500	20
Valin	5	5	40	100	15

3.8. Methylierung von t-RNA aus Dictyostelium mit einem S-30 Enzymextrakt aus E. coli

Pufferlösung:

- I. 330 mM Triäthanolamin/HCl pH 8,0; 55 mM β -ME;
33 mM MgCl₂.

Der bei Schmidt (1977) und Raettig (1976) beschriebene Standardansatz zur Methylierung von t-RNAs mit S-Adeno-

syl-Methionin wurde wegen der hohen Kosten von ^3H -SAM etwas modifiziert. Es wurden üblicherweise 0,5 A_{260} t-RNA in einem 90 μl Ansatz methyliert. Ferner enthielt der Ansatz 9 μl Puffer I, 48 μM ^3H -SAM (10-15 Ci/mmol) und ca. 280 μg Protein eines S 30 Überstandes aus E. coli MRE 600 (siehe 3.6.2.).

Sehr hohe spezifische Aktivitäten von ^3H -SAM wurden mit einer SAM-Lösung in 10^{-3} M H_2SO_4 auf die gewünschte spezifische Aktivität verdünnt und, falls erforderlich, unmittelbar vor dem Test zur Trockene eingeengt. Die Ansätze wurden 3 Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens Phenol/Chloroform 1:1 gestoppt. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Phase nochmals mit Phenol/Chloroform 1:1 ausgezogen. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann viermal mit je 100 μl Wasser extrahiert und zum Abtrennen des überschüssigen SAM's auf eine Sephadex G 25 Säule ($\varnothing$ 1 cm, Länge 1 m) gegeben. Es wurde mit Wasser hydrostatisch eluiert.

3.9. Bausteinanalyse von t-RNAs

Zur Identifizierung von t-RNA Bausteinen werden hauptsächlich drei Verfahren verwendet:

- 1). Nicht radioaktivmarkierte t-RNAs werden nach Randerath zu Nukleosiden verdaut, mit Na-meta-perjodat an der Ribose zu Dialdehyden oxidiert, mit ^3H - NaBH_4 zu tritierten Trialkoholen reduziert und auf Zellulose DC-Platten zweidimensional getrennt.
- 2). Nach Rogg werden hauptsächlich mit radioaktiv markiertem Methionin bzw. SAM-markierten t-RNAs zu Nukleosiden abgebaut und zweidimensional getrennt.
- 3). ^{32}P -markierte oder ^{14}C methylierte t-RNAs werden nach Nishimura zu Nukleotiden verdaut und anschließend auf Avicel^R-Platten zweidimensional getrennt.

3.9.1. Nukleosidanalyse durch nachträgliche ³H-Markierung nach Randerath (1972)

Der Verdauungsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

Bicine 0,3 M pH 7,8	5 ul
MgCl ₂ 0,1 M	5 ul
Alkalische Phosphatase 1 mg/ml	10 ul
Schlangengiftdiesterase 2 mg/ml	5 ul
RNAase A 2 mg/ml	5 ul
Aqua bidest.	20 ul
ca. 1 A ₂₆₀ t-RNA (zur Trockene eingeengt).	

Es wurde über Nacht bei 37°C verdaut. 10 ul dieses Hydrolysats = 0,2 A₂₆₀ t-RNA wurden mit 3 ul NaJO₄ 20 mM und 37 ul H₂O versetzt und 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde die Probe auf 4°C abgekühlt und mit 5 ul Phosphatpuffer 150 mM pH 7,0 und 4 ul ³H-NaBH₄ 0,1 M (2,5 Ci/mmol) versetzt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur 3 Stunden im Dunkeln. Überschüssiges Borhydrid wurde unter einem gut ziehenden Abzug mit 100 ul 1M Essigsäure zerstört und der Ansatz dann im Exsikkator zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 30 ul 0,1 M HCOOH gelöst. Mindestens 2 x 10⁶ cpm wurden auf eine DC-Zelluloseplatte aufgetragen und in Fließmittel A in der 1. Dimension und Fließmittel B in der 2. Dimension getrennt. Die 2. Dimension wurde durch Anheften von 6 cm Whatman Nr. 1 Papier verlängert.

Die DC-Platte wurde nach dem Entwickeln mit einer 7%igen (w/v) PPO/Äther-Lösung übergossen und bei -80°C auf einem Kodak RP X-omat Film 3-5 Tage exponiert. Nach dem Entwickeln der Filme wurden die Nukleosid-Trialkohole von der Zelluloseplatte abgekratzt, mit 500 ul 0,5 M NH₄OH und 10 ml Dioxanscintillator versetzt und die Radioaktivität gezählt.

3.9.2. Nukleosidtrennung nach Rogg (1976)

300 μ l wässrige t-RNA-Lösung = 1-2 A_{260} wurden mit 10 μ l 0,7 M Ammoniumformiatpuffer pH 7,6, 25 μ l alkalischer Phosphatase 1 mg/ml, 15 μ l Schlangengift-diesterase 2 mg/ml und 10 μ l RNAase A 2 mg/ml über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die Mischung zur Zerstörung von cyclischen Nukleotiden mit 5 μ l Ribonuklease T_1 0,93 mg/ml versetzt und 2 Stunden bei 37°C belassen. Die ganze Probe wurde dann in eine blaue Eppendorf Pipettenspitze gefüllt, in deren Öffnung zuvor ein mürber Wollfaden gesteckt worden war. Mit Hilfe dieses als Docht dienenden Fadens wurde ein gleichmäßiger Auftrag des sehr großen Volumens gewährleistet. Es wurde dann in Fließmittel C in der 1. Dimension und Fließmittel D in der 2. Dimension getrennt.

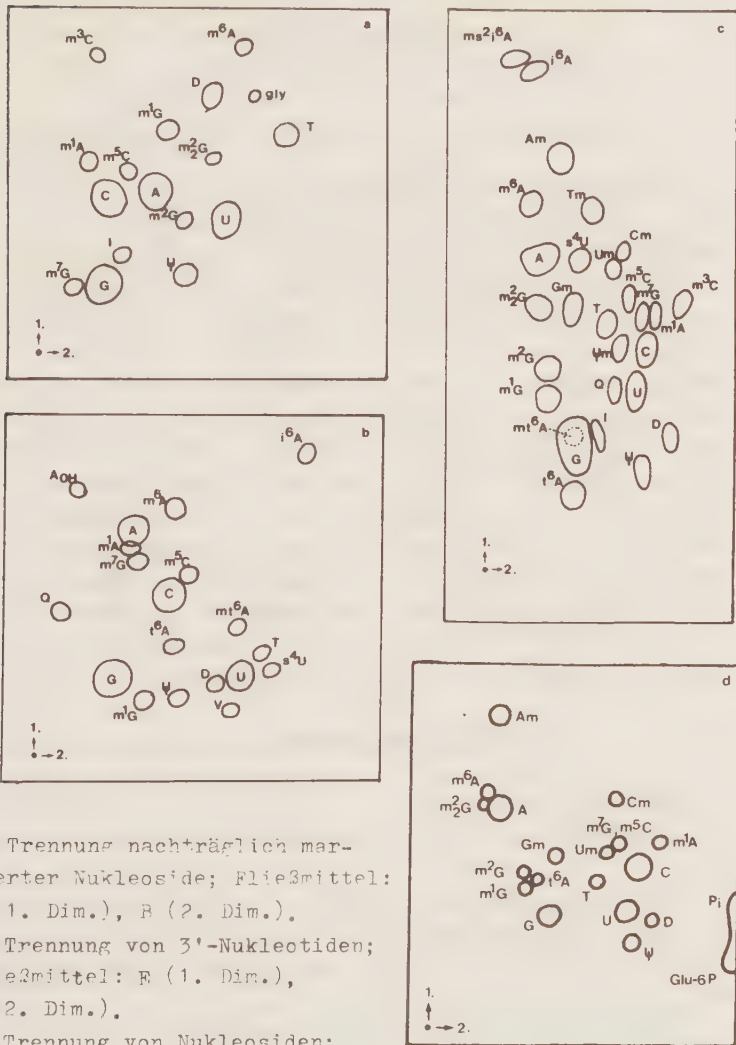
3.9.3. Nukleotidtrennung nach Nishimura (1972)

Ca. 1 A_{260} zur Trockene eingedampfte t-RNA wurde in 4 μ l Ribonuklease T_2 500 U/ml gelöst. Es wurde zentrifugiert und dann die Lösung quantitativ in eine Kapillare überführt. Nach 45 Minuten bei 37°C wurde der Ansatz auf eine 10 x 10 cm Avicel^R-Platte aufgetragen und in Fließmittel E (1. Dimension) und Fließmittel F (2. Dimension) entwickelt.

Ribonuklease T_2 ist eine Exonuklease, die als Spaltprodukte 3'-Phosphate (Np), ein Nukleosid des 3'-Endes (N) und ein 3',5'-Nukleotid (pNp) liefert. Sie spaltet nicht an einer Ribosemethylierung, so daß hier Dinukleotide entstehen ($N_m pNp$). Diese sind auf dem Chromatogramm schwer zu identifizieren. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, kann neuerdings mit Ribonuklease P_1 hydrolysiert werden, die 5'-Nukleotide (pN) liefert und auch nach Ribosemethylierungen spaltet.

Die Spaltprodukte werden in Fließmittel G in der 1. und Fließmittel H in der 2. Dimension getrennt.

Abb. 13: Schematische Darstellung der Mobilität von Nukleosiden und Nukleotiden nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie.



a) Trennung nachträglich markierter Nukleoside; Fließmittel: A (1. Dim.), B (2. Dim.).

b) Trennung von 3'-Nukleotiden; Fließmittel: E (1. Dim.), F (2. Dim.).

c) Trennung von Nukleosiden; Fließmittel: C (1. Dim.), D (2. Dim.).

d) Trennung von 5'-Nukleotiden; Fließmittel: G (1. Dim.), H (2. Dim.).

3.10. Präparation von Polysomen

Pufferlösungen:

- I. 0,05 M Hepes pH 7,5; 0,04 M $MgCl_2$; 0,02 M KCl;
5% (w/v) Saccharose; 4% (v/v) Triton X 100.
- II. 0,05 M Hepes pH 7,5; 0,04 M $MgCl_2$; 0,02 M KCl;
22% (w/v) Saccharose; 4% (v/v) Triton X 100.
- III. 0,05 M Hepes pH 7,5; 0,04 M $MgCl_2$; 0,02 M KCl.

Zur präparativen Polysomenisolation wurden 600 ml HL-5 Medium mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml drei Minuten bei $3000 \times g$ abzentrifugiert und anschließend in 4 ml Puffer I suspendiert. Danach wurde die Suspension bei $4^\circ C$ fünf Minuten auf einem Whirl-Mix geschüttelt und dann mit 4 ml Puffer II versetzt. Es wurde dann fünf Minuten mit $5000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand mit 8 ml Puffer III versetzt. Die Lösung wurde auf 6 lineare Saccharose Gradienten (5-22% (w/v) Saccharose in Puffer III) gelegt und bei $3^\circ C$ zwei Stunden mit $100\,000 \times g$ zentrifugiert. Die Gradienten wurden danach von unten nach oben mit einer Varioperpex Pumpe (LKB) in Stellung 5-6 $\times$ 10 durch eine Durchflußküvette gepumpt. Diejenigen Fraktionen, die Polysomen enthielten, wurden vereinigt und mit 2,5 Volumen abs. Äthanol und 2% K-acetat bei $-20^\circ C$ über Nacht gefällt.

3.11. RPC-5 Chromatographie

Pufferlösung:

- I. 0,01 M Na-acetat; 0,01 M Mg-acetat pH 4,6.

An RPC-5 Säulen kann man Gesamt-t-RNA grob in die spezifischen Arten trennen. Das Prinzip und die Präparation des Säulenmaterials sind bei Raettig (1976) beschrieben.

Die Säulen wurden mit 0,25 M NaCl in Puffer I äquilibriert, anschließend die t-RNAs aufgetragen und mit einem

linearen Kochsalzgradienten von 0,25 M - 1,0 M in Puffer I eluiert. Danach wurde das Säulenmaterial mit 2,0 M NaCl in Puffer I gewaschen.

3.12. Zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die ananalytische zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde modifiziert nach der von Fradin et al. (1970) beschriebenen Methode durchgeführt. Je nach Menge der zu trennenden t-RNA wurden Gele von 0,8 x 200 x 400 mm bzw. 3 x 200 x 400 mm in der 1. Dimension und 0,8 x 300 x 300 mm bzw. 3 x 300 x 300 mm in der 2. Dimension verwendet.

Lösungen:

- I. 10% (w/v) Acrylamid; 0,4% (w/v) Bisacrylamid; 4 M Harnstoff; 0,08 M Tris/ H_3BO_3 pH 8,3; 0,001 M EDTA.
- II. 5,4% (w/v) Acrylamid; 0,286 % (w/v) Bisacrylamid; 4 M Harnstoff; 0,008 M Tris/HCl pH 6,7.
- III. 20% (w/v) Acrylamid; 1,04% (w/v) Bisacrylamid; 4 M Harnstoff; 0,08 M Tris/ H_3BO_3 pH 8,3; 0,001 M EDTA.
- IV. 0,08 M Tris/ H_3BO_3 pH 8,3; 0,001 M EDTA.

Die t-RNAs wurden in der 1. Dimension diskontinuierlich in einem 10%igen Trenngel I von 31 cm Länge und einem 5,4%igen Sammelgel II von 7 cm Länge getrennt. Die Polymerisation beider Gele wurde durch 0,05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ und 0,05% (w/v) TMED gestartet.

Mit Hilfe eines geeigneten Kunststoffkammes, den man in das Sammelgel einbringt, erhält man Geltaschen von 0,8 x 10 x 20 mm bzw. 3 x 10 x 20 mm.

Für die 2. Dimension wurden die entsprechenden Gelstücke der 1. Dimension horizontal auf den unteren Rand einer 30 x 30 cm Glasplatte gelegt. Die seitlichen Ränder

wurden mit Spacern abgedichtet und die zweite Glasplatte aufgelegt. Das Gelstück der 1. Dimension wurde in ein 10%iges Gel I eingebettet und danach ein 20%iges Gel II aufpolymerisiert. Die Polymerisation des 20%igen Gels wurde mit 0,075% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ und 0,075% (w/v) TMED gestartet.

In beiden Dimensionen wurde Puffer IV als Elektrodenpuffer verwendet. Die seitlichen Begrenzungen der Elektrophoresekammern wurden zusätzlich mit einem Agar-Gel abgedichtet.

3.12.1. Ausführung der Gelelektrophorese

Pufferlösung:

I. 0,1 M Na-acetat pH 4,5; 4 M Harnstoff; 60% (w/v) Saccharose; 1% (w/v) Xylencyanol FF.

0,5 - 4 A₂₆₀ t-RNA wurden in 10-15 µl Puffer I gelöst und in die Tasche des Gels der 1. Dimension eingebracht. Die t-RNAs wurden in der 1. Dimension bei Raumtemperatur mit konstant 400 Volt soweit getrennt, bis der blaue Marker das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde ein ca. 1,5 cm breiter Gelstreifen, der die t-RNAs enthielt, ausgeschnitten und in die 2. Dimension (3.12.) überführt. Hier wurde aufsteigend bei 4°C mit konstant 400 Volt elektrophoretisiert.

Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der Dicke der Gele. Wurden 0,8 mm Gele verwendet, so war die Trennung in der 1. Dimension nach etwa 26 Stunden und in der 2. Dimension nach etwa 96 Stunden beendet. Bei Verwendung von 3 mm Gelen verlängerte sich die Zeitspanne um etwa 12 Stunden in der 1. Dimension und um etwa 24 Stunden in der 2. Dimension.

Die t-RNAs wurden durch verschiedene Methoden im Polyacrylamidgel sichtbar gemacht:

- a) entweder durch Fluoreszenzlöschung eines bei 254 nm anregbaren Fluoreszenzindikators (Hassur und Whitlock, 1974),
- b) durch Anfärben mit kationischen Farbstoffen
- c) oder durch Fluorographie bzw. Autoradiographie radioaktiv markierter t-RNAs.

Die Ermittlung der t-RNAs durch Fluoreszenzlöschung hat den großen Vorteil, daß hier die t-RNAs als native Moleküle vorliegen, während sie bei den meisten anderen Verfahren im Gel denaturiert werden. Allerdings benötigt man hier größere Mengen von t-RNA.

Das Gel wurde auf eine, mit durchsichtiger Haushaltsfolie abgedeckte DC-Platte gelegt, die mit einem Fluoreszenzindikator beschichtet war. Dann wurde das Gel mit einer UV-Lampe angestrahlt, wobei die t-RNAs als bläuliche Punkte sichtbar wurden.

Das Färben mit kationischen Farbstoffen geschieht meistens in schwach saurer Lösung. Dadurch werden die t-RNAs in den Gelen denaturiert und können nicht mehr diffundieren. Gefärbt wurde entweder mit Methyleneblau oder mit Ethidiumbromid.

Während die mit Methyleneblau gefärbten Gele die t-RNAs nach dem Entfärben des Hintergrundes unter fließendem Wasser als bläuliche Punkte erkennen lassen, lassen sich die mit Ethidiumbromid gefärbten t-RNAs nur während UV-Anregung erkennen. Sie können jedoch mit einer Polaroidkamera unter Verwendung eines Kodak No. 23 A Orangefilters dokumentiert werden.

In vivo mit ^{32}P markierte t-RNAs wurden ohne weitere Vorbehandlung durch Autoradiographie ermittelt. Es wurde eine Glasplatte entfernt, das Gel mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf Agfa Röntgenfilmen exponiert.

Dies geschah zweckmäßig bei -20°C , um eine Diffusion der t-RNAs zu vermeiden.

Tritium-markierte t-RNAs wurden durch Fluorographie ermittelt. Hierzu wurden die Gele nach einer von Bonner und Laskey (1974) beschriebenen Methode präpariert. Die Gele wurden zweimal 30 Minuten in DMSO entwässert. Danach wurden sie in eine 20%ige (w/w) Lösung von PPO in DMSO gelegt und dort 3 Stunden belassen. Anschließend wurden die Gele gewässert, wobei das wasserunlösliche PPO molekulardispers im Gel ausfiel. Nach dem Trocknen der Gele wurden sie auf Kodak Filmen bei -80°C exponiert.

3.12.3. Elution von t-RNA aus Polyacrylamidgelen

Lösungen:

I. 5% (w/v) Acrylamid; 0,2% (w/v) Bisacrylamid;
0,05 M Tris/HCl pH 7,5; 0,05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$;
0,05% (w/v) TMED.

II. 0,05 M Tris/HCl pH 7,5.

Zur Elution der t-RNAs wurden Glassäulen der Größe 8 x 110 mm verwendet. Das untere Ende der Säule wurde mit einem 5%igen Gel I verschlossen. Zur Reinigung wurden die Gele über Nacht mit 2 mA pro Röhrchen vorelektrophoretisiert. Als Elektrodenpuffer wurde Lösung II verwendet.

Nach der Vorelektrophorese wurde der Puffer gewechselt und die Gelstücke mit der zu eluierenden t-RNA in die Röhrchen gefüllt. Bei radioaktiv markierten t-RNAs wurden 1-2 A_{260} "kalte" Carrier-t-RNA zugesetzt. Mit 2 mA pro Röhrchen wurde nun die t-RNA durch das 5%ige Gel in Dialyseschläuche, die 500 μl Puffer II enthielten, elektrophoretisch eluiert. Danach wurde einmal 1 Stunde gegen 1 M NaCl und zweimal je 1 Stunde gegen Aqua bidest. dialysiert. Anschließend wurde die Lösung entweder lyophilisiert oder mit 2,5 Volumen abs. Äthanol die t-RNA gefällt.

3.13. Mapping eines zweidimensionalen Polyacrylamidgels von t-RNA aus Dictyostelium Discoideum

3.13.1. Identifizierung unbeladener t-RNAs

Pufferlösung:

I. 0,3 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM Na-acetat pH 4,5.

Vier A₂₆₀ Gesamt-t-RNA wurden in einem 3 mm dicken Gel zweidimensional getrennt (3.12.). Nach Färbung mit Methylblau wurden Gelstücke, die eine t-RNA Spezies enthielten, mit einem Korkbohrer ausgestanzt. Jedes dieser Gelstücke wurde dann in einem Mörser zur Trockene zerrieben, wobei ein feinkörniges Pulver erhalten wurde. Dieses wurde in 500 ul Puffer I und 500 ul 80%igem Phenol in Puffer I aufgenommen und gut verrieben. Es wurde 2-3 Stunden lang gerührt und die Suspension bei 10 000 x g zentrifugiert. Nach Extraktion der Phenolphase mit weiteren 500 ul Puffer I wurde den vereinigten wässrigen Phasen 2 A₂₆₀ t-RNA-freie r-RNA (3.5.) zugesetzt und die Ribonukleinsäuren mit 2,5 Volumen abs. Ätanol gefällt. Nach Zentrifugation wurde das getrocknete Sediment in 220 ul destilliertem Wasser gelöst und jeweils 10 ul in 20 Eppendorfgefäße portioniert. Jedes dieser Aliquots wurde dann mit einer tritierten Aminosäure in folgendem Standardansatz auf Akzeptoraktivität getestet:

Na-cacodylat 1 M pH 7,5	5 ul
ATP (neutralisiert mit NaOH) 100 mM	5 ul
MgCl ₂ 200 mM	2 ul
³ H-Aminosäure	2 ul
S-100 Überstand aus Dictyostelium	
entsprechend 100 ug Protein	10 ul
eluierte t-RNA	10 ul
Aqua bidest.	ad 50 ul

Es wurde bei 22°C 60 Minuten lang inkubiert und 40 µl auf ein Filterplättchen pipettiert. Die weitere Aufarbeitung ist in Sektion 3.7. beschrieben.

3.13.2. Identifizierung einer vorbeladenen t-RNA

Lösung:

I: NH_4OH konz. 0,5 ml; H_2O_2 30% 49,5 ml.

2 A_{260} Gesamt-t-RNA wurden mit einer tritiierten Aminosäure beladen (3.7.). Anschließend wurde die t-RNA in einem 3 mm dicken Gel zweidimensional getrennt (3.12.). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und die t-RNA enthaltenden Gelstücke unter UV-Bestrahlung ausgestochen. Hierzu ist ein ausreichender Schutz des Gesichtes und der Hände erforderlich.

Die Gelstücke wurden dann in 500 µl Lösung I 3-5 Stunden lang bei 37°C geschüttelt, wobei sie sich weitgehend auflösten. Die Radioaktivität wurde dann in 5 ml Dioxan Szintillator gezählt.

Auf diese Weise wurden alle 20 Aminosäuren getestet.

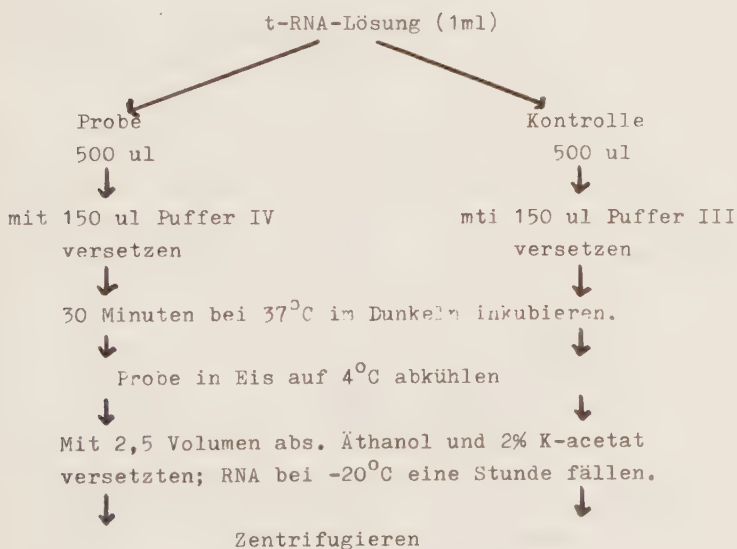
3.14. Messung des Beladungszustandes von t-RNAs in vivo

Pufferlösungen:

- I. 70% Äthanol; 20 mM Na-acetat pH 5,1.
- II. 10 mM Na-acetat pH 5,1; 10 mM EDTA.
- III. 100 mM Na-acetat pH 4,6
- IV. 2,14 mg Na-meta-Perjodat in 1 ml Puffer III.
- V. 690 µl Äthylenglycol in 100 ml Puffer III.
- VI. 3,6 M Tris/HCl pH 8,2

Die Zellkultur wurde bei 22°C unter starkem Schütteln in 9 Volumen Puffer I geschüttet. Nach einer Minute

wurde die Suspension in Eis auf 4°C abgekühlt und die Zellen bei 3000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit dem Äthanolüberstand in ein Corex Glas überführt, erneut zentrifugiert und in 5 ml Puffer II suspendiert. Nach Zugabe von 250 µl einer 10%igen SDS-Lösung und 5 ml 80%igem Phenol in Puffer II wurde 10 Minuten geschüttelt und anschließend bei 12 000 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgehoben und die Phenolphase erneut mit 3 ml Puffer II extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/i-Amylalkohol (100 : 100 : 1) versetzt, drei Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 2,5 Volumen abs. Äthanol und 2% K-acetat versetzt und die t-RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 1 ml Puffer III gelöst. Es wurde nach folgendem Schema weitergearbeitet:



Sedimente in 500 μ l Puffer V aufnehmen.



10 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubieren.



In Eis auf 4°C abkühlen.



RNA mit 2,5 Volumen abs. Äthanol und 2% K-acetat bei -20°C über Nacht fällen.



Sedimente in 100 μ l destilliertem Wasser lösen und mit 100 μ l Puffer VI bei 37°C für 30 Minuten inkubieren.



RNA mit 2,5 Volumen abs. Äthanol über Nacht bei -20°C fällen.

- 3.15. In vitro Markierung von t-RNA-Fragmenten mit γ -³²P-ATP und Polynukleotidkinase aus mit T₄ Phagen infiziertem E. coli

- 3.15.1. Markierung nach Grupa und Randerath (1979)

In einem Ansatzvolumen von 10 μ l wurden t-RNA Fragmente ausgehend von 2 μ g t-RNA in folgendem Reaktionsgemisch inkubiert:

- 40 mM Tris/HCl pH 8,7
- 13 mM MgCl₂
- 10 mM Dithiothreitol
- 20 μ M γ -³²P-ATP (500 Ci/mmol)
- 3 U Polynukleotidkinase

Nach 25 Minuten bei 38°C wurden 8 mU Apyrase zupipettiert und weitere 20 Minuten bei 38°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz lyophilisiert.

3.15.2. Markierung nach Silberklang et al. (1979)
(modifiziert)

Oligonukleotide nach Ribonuklease T₁-Spaltung von 1 µg
t-RNA wurden in folgendem 10 µl Ansatz inkubiert:

- 10 mM MgCl₂
- 15 mM β-ME
- 30 µM γ-³²P-ATP (500 Ci/mmol)
- 2 U Polynukleotidkinase

Nach einer Stunde bei 38°C wurden 20 nmol Glukose und
0,003 U Hefe-Hexokinase zupipettiert. Nach weiteren
20 Minuten Inkubation bei 38°C folgten zwei Isotopen-
verdünnungsschritte mit je 1 nmol "kaltem" ATP. Zwischen
beiden Schritten wurde je 20 Minuten bei 38°C inkubiert.
Danach wurde der Ansatz lyophilisiert.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung von Gesamt-t-RNA aus Dictyostelium Discoideum

Eukaryotische Organismen unterscheiden sich stark von den prokaryotischen. Dies bedeutet, daß beim Aufschluß der eukaryotischen Zelle und bei der Isolierung von Biomolekülen zum Teil anders vorgegangen werden muß als bei der prokaryotischen Zelle. In der Literatur sind viele Methoden zum Aufschluß und zur Isolierung von t-RNA aus Eukaryoten beschrieben, jedoch lag zu Beginn dieser Arbeit keine Vorschrift für Dictyostelium vor.

Für die Präparation analytischer Mengen t-RNA aus Dictyostelium erwies sich die Methode von Yang & Novelli (1971) als gut geeignet. Sie wurde dahingehend modifiziert, daß die Zellen durch Reiben im Mörser mit Alkoea aufgeschlossen wurden. Weiter umfaßt die Methode die Extraktion der t-RNA mit Phenol, Fällung mit 1 M NaCl und DEAE-Zellulose-Chromatographie (siehe 3.3.1.). Größere Zellmengen wurden direkt mit Phenol aufgeschlossen, ohne zuvor die Zellen mit Alkoea zu zerreiben. Ferner wurde die DEAE-Zellulose-Chromatographie nach Rogg et al. (1969) im Batch-Verfahren durchgeführt und danach eine fraktionierte Isopropanolfällung angeschlossen (siehe 3.3.2.). Die Zell- bzw. t-RNA-Ausbeute für beide Verfahren wird in Tabelle 3. verglichen. Die Angaben beziehen sich auf 1×10^9 vegetative Zellen. Die relative Ausbeute an t-RNA aus Fermenterzuchtungen ist geringer als bei Zuchtungen im analytischen Maßstab. Diese ist vor allem auf die weniger schonende Zentrifugation in der Durchflußzentrifuge bedingt. Dennoch rechtfertigt bei größeren Präparationen der geringere

Arbeitsaufwand der Fermenterzüchtung diesen relativen Verlust an Zellen und damit die geringere t-RNA Ausbeute.

Tab. 3: Vergleich der Zell- bzw. t-RNA-Ausbeute für Züchtungen im analytischen und präparativen Maßstab.

	Züchtung im Erlenmeyerkolben		Züchtung im Fermenter	
	Feuchtgewicht	OD t-RNA	Feuchtgewicht	OD t-RNA
vegetative Zellen	1,5 - 2,0 g	15 - 25	0,5 - 1,0 g	17
Präaggregations Zellen	1,0 - 1,5 g	12 - 20	0,3 - 0,4 g	7

Die Zell- bzw. t-RNA-Ausbeuten sind in allen Fällen auf 1×10^9 Zellen bezogen.

Die t-RNA aus beiden Präparationen war noch mehr oder weniger stark mit DNA und 5S r-RNA kontaminiert. Diese konnten durch Gelchromatographie an Sephadex G 200 oder durch präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese entfernt werden.

Für viele Analysen reichte es vollständig aus, mit der "rohen" t-RNA zu arbeiten. Nur die Nukleosidanalyse nach Randerath erfordert reinste t-RNA.

Die biologische Aktivität der isolierten t-RNAs wurde durch die Beladbarkeit mit radioaktiven Aminosäuren getestet. Ein 250 μ l Ansatz enthielt:

Hepes pH 7,2	100 mM
Mg-acetat	10 mM
KCl	10 mM
ATP (neutral)	2 mM
^{14}C -Aminosäure	25 μ M
S-100 Überstand	50 μ g Protein
t-RNA	1 A ₂₆₀

Die Akzeptoraktivitäten der isolierten t-RNAs waren vergleichbar mit Literaturwerten für andere eukaryotische t-RNAs.

Während der Entstehung dieser Arbeit erschien eine Veröffentlichung von Palatnik und Katz (1977), in der t-RNA aus *Dictyostelium Discoideum* bezüglich ihrer Aminoacylierbarkeit systematisch untersucht wurde und die Ansätze für viele Aminosäuren optimiert wurden. Diese Bedingungen sind in 3.7. zusammengestellt und wurden in dieser Arbeit übernommen.

4.2. Modifikationen der t-RNA aus *Dictyostelium* zu verschiedenen Zeiten des Lebenszyklus

Die t-RNAs enthalten als Bausteine nicht nur die für RNA typischen Nukleoside Adenosin, Cytidin, Guanosin und Uridin, sondern zu einem großen Teil einfach- oder hypermodifizierte Nukleoside. Je höher ein Organismus auf der Evolutionsskala steht, umso stärker ist seine t-RNA in ihren Nukleosiden modifiziert. Dieses Modifikationsmuster kann variieren, wenn eine Zelle Veränderungen erfährt, z.B. bei schnellem oder langsamem Wachstum, während der Differenzierung der Zelle oder wenn eine tierische Zelle zur Krebszelle wird.

Walter Schmidt konnte für die niedrige Pflanze *Acetabularia mediterranea* zeigen, daß sich das Modifikationsmuster der t-RNA während des Entwicklungszyklus dieses Organismus ändert (1977).

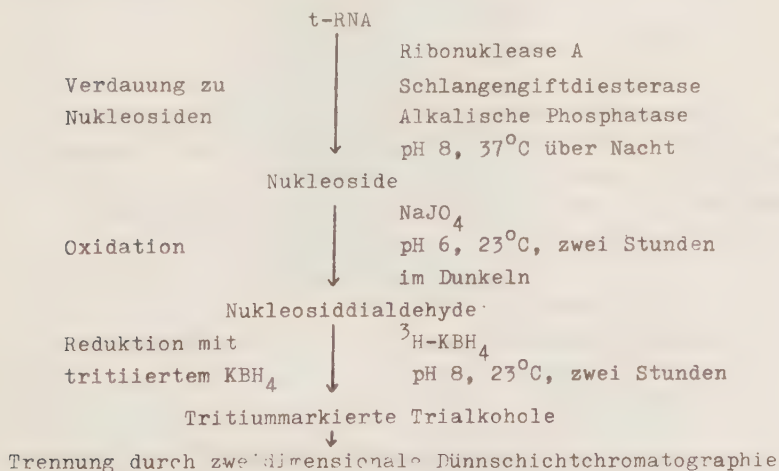
Eine ähnliche Untersuchung wurde in dieser Arbeit für *Dictyostelium Discoideum* durchgeführt.

4.2.1.

Modifikationsmuster der Gesamt-t-RNA aus Dictyostelium

Es bieten sich verschiedene Methoden an, um das Modifikationsmuster der t-RNA zu bestimmen. Methylierte Basen lassen sich nachweisen durch in vivo Markierung mit radioaktivem Methionin und anschließender zweidimensionaler Trennung der Basen, Nukleoside oder Nukleotide. Dieses Verfahren ermöglicht es nicht, die Hauptbasen und die nicht methylierten Basen zu bestimmen. Ferner muß bei diesem Verfahren in einem Mangelmedium ohne- bzw. mit sehr wenig Methionin gearbeitet werden, um die spezifische Radioaktivität nicht zu stark durch endogenes Methionin zu verdünnen und so ausreichende Markierung in der t-RNA zu erhalten.

Diese Schwierigkeiten umgeht das Verfahren nach Randerath (1972), daß es erlaubt, nachträglich eine radioaktive Markierung in die Komponenten der t-RNA einzuführen. Hierzu wird die isolierte t-RNA enzymatisch zu Nukleosiden verdaut. Diese werden dann durch Perjodat an der Ribose oxidativ gespalten und schließlich die erhaltenen Dialdehyde mit tritiiertem KBH_4 zu Alkoholen reduziert.



Nach der Trennung werden die derivatisierten Nukleoside durch Fluorographie ermittelt. Die quantitative Auswertung erfolgt, indem man die radioaktiven Bereiche auskratzt und die Radioaktivität zählt. Die Summe aller Counts wird gleich 100% gesetzt und dann für jedes Nukleosid der entsprechende Prozentsatz ermittelt.

Die Angabe erfolgt in Mol%, d.h. Mol Nukleosid pro 100 Nukleoside.

Unter der Annahme, daß die t-RNA im Durchschnitt 75 Nukleoside enthält, entspricht 1 Mol% etwa 1,33 Mol/ Mol t-RNA.

Es wurden folgende Stadien des Lebenszyklus von Dictyostelium untersucht:

- a) vegetatives Wachstum 6×10^5 Zellen/ ml
 9×10^5 Zellen/ ml
 $1,5 \times 10^6$ Zellen/ ml
 6×10^6 Zellen/ ml
- b) Präaggregations- 0,5 h in PO_4 -Puffer geschüttelt
 stadium 4 h in PO_4 -Puffer geschüttelt
 8 h in PO_4 -Puffer geschüttelt
 16 h in PO_4 -Puffer geschüttelt
- c) Sporen

Abb. 14 zeigt eine typische Analyse der t-RNA-Bausteine nach der Methode von Randerath. Während der verschiedenen Stadien traten qualitativ keine Unterschiede auf. In der t-RNA von Dictyostelium konnten folgende Modifikationen nachgewiesen werden:

- 7-Methylguanosin (m^7G)
- Pseudouridin (P)
- 2-Methylguanosin (m^2G)
- 5-Methylcytidin (m^5C)
- 1-Methyladenosin (m^1A)
- 6-Methyladenosin (m^6A)

N^2-N^2 -Dimethylguanosin (m^2_2G)
1-Methylguanosin (m^1G)
5-Methyluridin (m^5U bzw. Ribothymidin)
Dihydrouridin (hU)
3-Methylcytidin (m^3C)
Inosin (I)

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in der t-RNA von Dictyostelium noch andere Modifikationen vorkommen, die jedoch mit dieser Methode nicht erfaßt werden können. Dazu gehören beispielsweise an der Ribose methylierte Nukleoside, die der Perjodatspaltung nicht zugänglich sind, oder auch schwefelhaltige Nukleoside, die durch die chemische Umsetzung zerstört werden. So konnte mit einer anderen, indirekten Methode gezeigt werden, daß bestimmte t-RNAs aus Dictyostelium die Modifikation Q enthalten (siehe 4.5.3.).

Abb. 14: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung modifizierter Nukleoside in Gesamt-t-RNA aus Dictyostelium Discoideum.



Die Gesamt-t-RNA wurde zu Nukleosiden verdaut und diese mit Perjodat und tritiiertem Borhydrid modifiziert. Nach zweidimensionaler dünnschichtchromatographischer Trennung wurden die Nukleoside durch Fluorographie ermittelt.

4.2.2.

Quantitative Zusammensetzung der Nukleoside der t-RNA aus Dictyostelium Discoideum

Wichtig ist bei dieser Bestimmung der Nukleoside, daß die t-RNA frei ist von anderen RNA-Spezies, da auch diese während der Analyse zu Nukleosiden gespalten würden und so zu hohe Gehalte der Hauptbasen in der t-RNA vortäuschen würden.

Die t-RNAs wurden daher auf zweierlei Weise nachgereinigt: einmal durch Gelchromatographie an Sephadex G 200, zum anderen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe 3.4.1. und 3.4.2.). Es zeigte sich, daß durch die Polyacrylamidgel-Elektrophorese keine weitere Reinigung mehr erzielt werden konnte. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse hier nicht getrennt aufgeführt. Vielmehr wurden sie zur Berechnung der Standardabweichung zusammengekommen.

Von jeder t-RNA wurden mindestens vier Analysen gemacht. Die Gehalte für die Nukleoside ergeben sich aus dem Mittel dieser Analysen.

Tabelle 4. zeigt die Werte für die t-RNAs aus den verschiedenen Stadien des Lebenszyklus.

Hauptsächlich im Ribothymidingehalt treten mit fortschreitender Entwicklung des Organismus signifikante Unterschiede auf, derart, daß der rT-Gehalt in der t-RNA abnimmt. Während die Werte im vegetativen Wachstum um 0,9 Mol% liegen, findet man nach etwa vier Stunden Entwicklung in Phosphatpuffer Werte um 0,5 Mol%. t-RNA aus Sporen enthält 0,45 Mol% Ribothymidin.

Nimmt man alle Werte der modifizierten Nukleoside des vegetativen Wachstums bzw. die Werte für 4 Stunden Entwicklung bis hin zu den Sporen zusammen, so ergibt sich das folgende Bild (Abb. 15.).

Es zeigt sich, daß nahezu alle modifizierten Nukleoside der t-RNA in ihren Gehalten während der Entwicklung niedriger liegen als während des Wachstums. Neben Ribothymidin nehmen die Gehalte der Modifikationen m^5C und Pseudouridin am deutlichsten ab.

Experiment 1a:

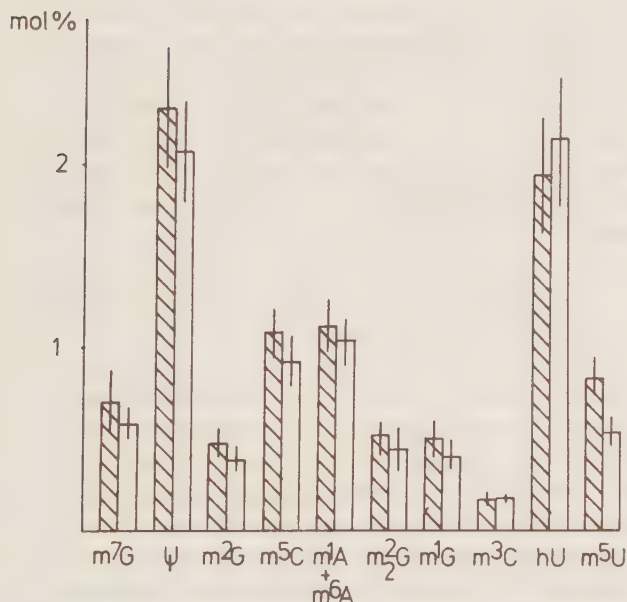
Nukleosidgehalt in vegetativen Zellen
(Mol%, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Zelldichte (Zellen/ml)	$4,7 \times 10^5$	1×10^6	$1,7 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$
Nukleoside				
U	$20,58 \pm 1,21$	$20,48 \pm 0,64$	$20,07 \pm 0,95$	$19,90 \pm 0,46$
A+I	$19,47 \pm 0,38$	$19,31 \pm 1,07$	$20,29 \pm 1,20$	$20,64 \pm 0,56$
C	$24,73 \pm 0,90$	$25,03 \pm 0,48$	$25,69 \pm 0,06$	$24,89 \pm 0,95$
G	$24,86 \pm 0,86$	$25,20 \pm 0,84$	$25,64 \pm 0,04$	$24,63 \pm 0,54$
m^5U	$0,90 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,14$	$0,71 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,09$
hU	$2,26 \pm 0,14$	$2,04 \pm 0,23$	$1,83 \pm 0,12$	$2,24 \pm 0,07$
U	$2,92 \pm 0,16$	$2,55 \pm 0,22$	$2,01 \pm 0,04$	$2,54 \pm 0,17$
m^1A+m^6A	$1,23 \pm 0,11$	$1,09 \pm 0,18$	$0,99 \pm 0,05$	$1,19 \pm 0,11$
m^3C	$0,20 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,05$
m^5C	$1,18 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,15$	$0,99 \pm 0,06$	$1,03 \pm 0,04$
m^2G	$0,64 \pm 0,10$	$0,48 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,04$
m^2G	$0,41 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,12$	$0,42 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,03$
m^1G	$0,47 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,10$	$0,40 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,05$
m^7G	$0,76 \pm 0,13$	$0,75 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,19$
total	100,61	100,19	100,12	100,43

Tabelle 4b: Nukleosidgehalt im Laufe der Entwicklung
(Mol%, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Stunden nach Einsetzen der Entwicklung	0,5	4	8	16	Sporen nach 8 Tagen
Nukleoside					
U	20,64 $\pm$ 0,10	20,36 $\pm$ 0,87	20,24 $\pm$ 0,38	23,25 $\pm$ 0,04	20,27 $\pm$ 0,78
A+I	19,85 $\pm$ 0,13	19,74 $\pm$ 0,52	20,79 $\pm$ 0,67	21,03 $\pm$ 0,87	20,06 $\pm$ 0,99
C	24,62 $\pm$ 0,06	25,11 $\pm$ 0,78	23,70 $\pm$ 0,44	22,05 $\pm$ 0,26	24,87 $\pm$ 0,25
G	25,76 $\pm$ 0,09	25,85 $\pm$ 1,29	25,94 $\pm$ 0,40	26,04 $\pm$ 1,36	26,77 $\pm$ 0,03
m^5U	0,75 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,04
hU	2,11 $\pm$ 0,07	2,31 $\pm$ 0,14	2,15 $\pm$ 0,12	1,89 $\pm$ 0,32	1,68 $\pm$ 0,05
U	2,25 $\pm$ 0,15	2,42 $\pm$ 0,16	2,42 $\pm$ 0,29	1,96 $\pm$ 0,20	2,10 $\pm$ 0,02
m^1A+m^6A	1,07 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,12	1,03 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,05	1,01 $\pm$ 0,01
m^3G	0,17 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03
m^5C	0,83 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,05
m^2G	0,46 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,02
m^2G	0,43 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,02
m^1G	0,42 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01
m^7G	0,65 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,06
total	100,01	100,31	99,92	100,01	99,98

Abb. 15: Schematische Darstellung der Gehalte an modifizierten Nukleosiden während des vegetativen Wachstums und während der Entwicklung von *Dictyostelium Discoideum*



Alle Werte des vegetativen Wachstums einerseits und der Entwicklung andererseits wurden für jede Modifikation gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die schraffierten Säulen zeigen die Gehalte an modifizierten Nukleosiden in der Gesamt-t-RNA während des vegetativen Wachstums, die offenen Säulen zeigen die entsprechenden Werte für die Entwicklung bis hin zu den Sporen. Die Standardabweichungen, berechnet aus mindestens 16 Analysen wurden jeweils mit eingezeichnet.

4.3. Zweidimensionale Trennung der spezifischen t-RNAs aus Dictyostelium Discoideum in Polyacrylamidgelen

Im Gegensatz zu Prokaryonten lassen sich Eukaryonten, wie z.B. Dictyostelium, nur unter großem Zeit- und Materialaufwand in so großem Maßstab züchten, um die spezifischen t-RNAs mit den klassischen Methoden wie RPC-5- bzw. BD-Zellulose-Säulenchromatographie zu untersuchen. Es galt daher, Methoden zu wählen, die es gestatteten, relativ geringe Mengen t-RNA analytisch zu bearbeiten. Eine dieser Methoden ist die zweidimensionale Trennung der t-RNAs in Polyacrylamidgelen. Man kann so Gesamt-t-RNA bis hinunter zu $0,5 A_{260}$ in die für eine einzelne Aminosäure spezifischen t-RNAs auftrennen.

4.3.1. Abänderung des in der Literatur beschriebenen Verfahrens

Die zweidimensionale Trennung von t-RNAs an Polyacrylamidgelen wurde anfangs genau nach der von Fradin et al. (1975) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei werden die t-RNAs in der ersten Dimension in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (Trenngel: 10% Acrylamid in Tris/Borat-Puffer pH 8,3; Sammelgel: 5% Acrylamid in Tris/HCl-Puffer pH 6,7) mit einer konstanten Spannung von 400 Volt bei Raumtemperatur getrennt. Anschließend wird dann der Gelstreifen, der die t-RNA enthält, einem 20%igen Polyacrylamidgel aufpolymerisiert und bei 4°C mit einer Spannung von 400 Volt getrennt. Obwohl das Gel in der zweiten Dimension dicker war als das für die erste Dimension, gelang es nur unter sehr großen Schwierigkeiten, den fragilen Gelstreifen der ersten Dimension auf das 20%ige Gel aufzupolymerisieren. Ferner ließen sich die recht dicken Gele wegen ihres hohen Gehaltes an Acrylamid und Harnstoff nicht aufrock-

nen. Dieses Problem mußte gelöst werden, da in den später folgenden Experimenten die t-RNAs mit Tritium markiert werden sollten und eine Fluorographie nur mit trockenen Gelen möglich ist.

Daher wurde der Gelstreifen der ersten Dimension unten auf eine der Kammerplatten für die zweite Dimension geleert. Dann wurden die Seiten mit Spacern gleicher Dicke wie in der ersten Dimension begrenzt und die zweite Kammerplatte aufgelegt. Nun wurde ein Fuß aus 10%igen Gel gegossen, der den Gelstreifen der ersten Dimension völlig einschloß. Anschließend wurde auf diesen Fuß das 20%ige Gel der zweiten Dimension aufpolymerisiert. Die t-RNAs wurden in der zweiten Dimension von unten nach oben getrennt, d.h. die Anode befand sich im oberen Pufferbecken.

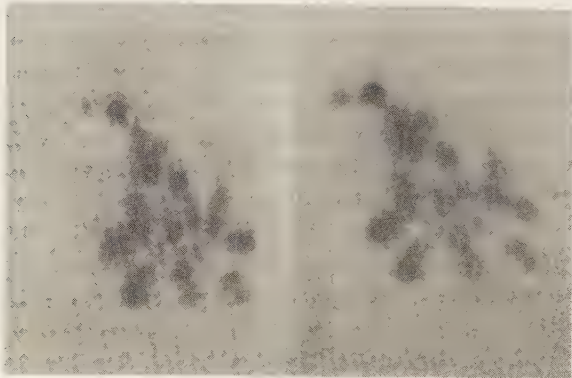
So konnte die Dicke des Gels von anfangs 4 mm auf 0,8 mm verringert werden. Diese Gele ließen sich nach dreißigminütiger Behandlung mit einer 5%igen Glycerinlösung problemlos auf einem Slab-gel-dryer der Fa. Hoefer Scientific Instruments trocknen.

4.3.2. Trennung spezifischer t-RNAs aus vegetativen Zellen und Zellen, die 14 Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt wurden

Um zu klären, ob sich das Muster der t-RNAs aus vegetativen Zellen und aus Zellen eines frühen Entwicklungsstadiums von Dictyostelium ändert, wurden die aus beiden Stadien präparierten Gesamt-t-RNAs in Polyacrylamid-Gelen zweidimensional getrennt. Abb. 16. zeigt die typischen Muster spezifischer t-RNAs für beide Entwicklungsstadien. Jeder Fleck repräsentiert mindestens eine spezifische Transfer-Ribonukleinsäure. Die Gesamt-t-RNA läßt sich demnach in ca. 40 individuelle t-RNAs auftrennen. Dies muß nicht zwangsläufig die Gesamtzahl aller t-RNA-Spezies und ihrer Isoacceptoren in Dictyostelium sein, da wegen der großen Ähnlichkeit im molekularen

Aufbau dieser Moleküle durchaus einige Spezies im Gel gleiches Laufverhalten zeigen können.

Abb. 16: Zweidimensionale Polyacrylamidgel- Elektrophorese von t-RNA aus vegetativen Zellen (a) und aus Zellen des Preaggregationsstadiums (b).



Je 0,5 A₂₆₀ t-RNA aus Zellen des vegetativen Stadiums (a) und des Preaggregationsstadiums (b) wurden in einem 0,8 mm dicken Gel zweidimensional elektrophoretisch getrennt (siehe 3.12.). Anschließend wurden die spezifischen t-RNAs mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Anregung photographiert.

Da diese Methode nur qualitative aber kaum quantitative Unterschiede erkennen läßt, kann man sagen, daß die t-RNA Muster für beide Stadien gleich sind. Dies stimmt mit Beobachtungen von Palatnik et al. (1977) überein, die die t-RNAs aus Dictyostelium mit Hilfe analytischer RPC-5 Säulen untersuchten. Auch sie konnten für die t-RNAs aus den oben genannten Entwicklungsstadien keine qualitativen Unterschiede finden, jedoch einige quantitative Änderungen für ganz bestimmte t-RNA Spezies.

4.3.3. Identifizierung der spezifischen t-RNAs des Gelmusters

Wie schon erläutert, stellt die zweidimensionale Polyacrylamidgel Elektrophorese eine hervorragende Methode dar, um geringste Mengen t-RNA in viele spezifische t-Acceptoren aufzutrennen.

Eine große Schwierigkeit verbindet sich jedoch mit dieser Methode: Es bereitet außerordentliche Mühen, die einzelnen t-RNA Spezies zu identifizieren.

Bei den herkömmlichen säulenchromatographischen Methoden erfolgte die Ermittlung der Lage der t-RNAs im Elutionsprofil in der Weise, daß man entweder die t-RNAs vor der chromatographischen Trennung mit einer spezifischen radioaktiv markierten Aminosäure belädt, oder nach der Chromatographie die t-RNA durch Aminoacylierung im Eluat sucht.

Die erste Methode ist bei der zweidimensionalen Polyacrylamidgel Elektrophorese kaum möglich, da das System mit einem pH von 8,3 ziemlich stark alkalisch ist. In diesem Milieu hydrolysiert die Aminosäure nach kurzer Zeit so weit von der t-RNA ab, daß eine Autoradiographie des Gels nicht mehr möglich ist.

Die zweite Methode wird durch die geringen Mengen an t-RNA und durch die denaturierenden Bedingungen während der Trennung durch 4 M Harnstoff limitiert.

Dennoch stehen einige Methoden für die Identifizierung der t-RNAs zur Verfügung:

- i) Die Gesamt-t-RNA wird mit einer tritiierten Aminosäure beladen, anschließend wird die Amino-
gruppe in eine Hydroxylgruppe überführt, wodurch die Hydrolyse verzögert wird. Nach Trennung der t-RNAs kann die beladene t-RNA im Gel durch Autoradiographie ermittelt werden.
- ii) Die t-RNAs werden nach der Elektrophorese aus dem Gel eluiert und anschließend jede t-RNA mit jeder Aminosäure beladen.

- iii) Die Gesamt-t-RNA wird mit einer tritiierten Aminosäure beladen, die t-RNAs durch zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt und danach die Gelstücke, die t-RNA enthalten, ausgestanzt. Das Gel wird aufgelöst und die Restradioaktivität im Szintillationszähler gezählt.
- iv) Die Gesamt-t-RNA wird mit einer "kalten" Aminosäure beladen, wodurch diese t-RNA an ihrem 3'-Ende keine freie vicinale Hydroxylgruppe mehr besitzt. Alle anderen t-RNAs werden dann an ihrem 3'-Ende mit Perjodat und tritiiertem NaBH_4 radioaktiv markiert. Nach der Trennung wird das Gel autoradiographiert.

Alle diese Methoden wurden im Laufe dieser Arbeit zur Identifizierung der t-RNAs angewendet, wenn auch mit unterschiedlichem Erfolg.

i) Diese Methode ist bei Hervé und Chapeville (1965) beschrieben. Man geht davon aus, daß die Hydrolyse der Aminosäure von der t-RNA um den Faktor 100 verzögert verläuft, wenn man den -Aminoester des 3'-Endes der t-RNA mit der Aminosäure in einen -Hydroxyester umwandelt.

Die Modifizierung erfolgt durch Diazotierung der -Aminogruppe mit HNO_2 , wobei in wässrigem Milieu die Diazogruppe zu einer Hydroxylgruppe hydrolysiert wird.

Zu bedenken ist, daß in der t-RNA sehr viele Aminogruppen vorhanden sind, die diazotiert werden können. Dadurch erhält man dann ein atypisches Laufverhalten der t-RNAs im Gel, das dann wiederum die Zuordnung unmöglich macht. Wegen dieser prinzipiellen Schwierigkeiten wurden mit dieser Methode keine t-RNA Spezies identifiziert.

ii) Die zweite Methode wurde nach persönlicher Mitteilung durch R. Martin* ausgeführt. Sie besitzt den Vorteil, daß theoretisch mit einem Gel alle t-RNAs identifiziert

*C.N.R.S., 15, Rue Descartes, Fac. Pharm., Univ. Louis Pasteur, Strasbourg, France.

werden können. Es werden alle Gelspots ausgestanzt, diese dann in einem Mörser zur Trockene zerrieben und anschließend mit Phenol und Puffer die t-RNAs eluiert. Für diese Analyse wurden in einem 3 mm Gel 4 A_{260} Gesamt-t-RNA aufgetrennt. Unter der Annahme, daß sich die t-RNA gleichmäßig auf alle 40 Spots verteilt, enthält ein Fleck 0,1 A_{260} spezifische t-RNA. Da jede eluierte t-RNA mit jeder Aminosäure auf ihre Akzeptoraktivität getestet werden muß, enthält ein Inkubationsansatz im Durchschnitt 0,005 A_{260} t-RNA.

Diese geringen Mengen und die Tatsache, daß die t-RNAs unter denaturierenden Bedingungen mit 4 M Harnstoff getrennt wurden, machen es unwahrscheinlich, mit dieser Methode alle getrennten t-RNAs zu identifizieren. Dennoch konnten auf diese Weise einige t-RNA Spezies charakterisiert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5. dargestellt. Für jede getestete Aminosäure wurden Leerwerte mit t-RNA-freien Gelstücken ermittelt, die in der selben Weise behandelt worden waren. Zusätzlich stellt jeder Wert für die betreffende Aminosäure einen Leerwert dar, bei dem diese Aminosäure nicht von der zu testenden Aminosäure akzeptiert wird. Alle diese Werte wurden zur Berechnung der Standardabweichung für die Aminosäureleerwerte herangezogen.

iii) Die dritte Methode umgeht die Schwierigkeit, eine t-RNA, die während der Trennung partiell denaturiert wurde, anschließend durch ihre Beladbarkeit mit einer Aminosäure zu identifizieren.

Vielmehr wird hier die t-RNA vor der Trennung mit einer tritiierten Aminosäure markiert. Da nach der Elektrophorese wegen der starken Hydrolyse die Gele nicht mehr autoradiographiert werden können, wird hier versucht, die Restradioaktivität in den ausgestanzten Gelstücken im Scintillationszähler zu ermitteln. Auch diese Versuche wurden mit 3 mm Gelen ausgeführt, um möglichst viel

Tabelle 5: Gel mapping durch Beladung der t-RNA's nach ihrer Elution aus dem Polyacrylamidgel.

Amino- sp.Akt.		Blanc St.Abweich.		Spot Nr.											
säure	Ci/mmol	cpm	(n=40)	1	3	11	13	15	16	18	19	20	30	33	
Ala	37	600	746 $\pm$ 215	347	792	466	892	1076	877	1465	841	674	698	947	
Arg	8	723	817 $\pm$ 234	445	1041	653	2393	750	749	1304	880	913	719	2359	
Asn	22	2617	2565 $\pm$ 680	1977	3366	2704	3470	6850	5091	2168	2093	1725	2003	3536	
Asp	15	1239	1255 $\pm$ 169	1041	1348	1173	1065	1535	3495	1299	1438	1493	1073	1156	
Glu	28	2990	3010 $\pm$ 1070	2525	3246	3238	3103	3708	3788	4364	2755	3394	3160	2845	
Gln	20	3327	3585 $\pm$ 543	2857	3676	2938	3676	3490	3390	4254	4763	3997	3205	3457	
Gly	23	3474	3946 $\pm$ 593	4239	4031	2964	4205	3300	3101	4677	4175	4705	4075	4415	
His	43	1163	1337 $\pm$ 408	639	1623	5017	1646	1260	1162	2027	1420	1374	1294	1377	
Ile	28	380	483 $\pm$ 144	449	1437	749	588	334	415	511	493	467	259	675	
Leu	50	805	906 $\pm$ 168	697	1676	933	1189	904	907	1078	742	1619	723	1085	
Lys	90	10542	11525 $\pm$ 1376	9557	12942	10938	11584	13300	13320	11136	9128	12325	11217	12321	
Met	8	5329	5307 $\pm$ 547	9196	4276	4651	5982	5231	5763	5236	5751	5888	4796	5485	
Pro	58	1232	1440 $\pm$ 379	884	1222	1482	1865	1446	1321	2233	4460	1628	1027	1516	
Ser	19	1632	2082 $\pm$ 421	1523	2013	1539	2506	2083	2320	2917	2365	2027	1789	2275	
Thr	2	348	378 $\pm$ 105	176	494	437	500	264	321	507	1608	323	377	411	
Trp	23	3307	3557 $\pm$ 505	2603	3798	3451	4380	3777	3677	3954	3788	3222	2804	3929	
Tyr	44	1384	1529 $\pm$ 323	856	1116	1487	1972	1593	1639	1684	1470	1833	4545	1794	
Val	31	809	1043 $\pm$ 401	616	890	779	3820	792	727	1904	1165	1419	889	1485	
Phe	133	940	1057 $\pm$ 285	683	600	3537	1375	1129	998	1473	1053	1327	1245	813	

4 A₂₆₀ Gesamt-t-RNA wurden in einem 3 mm Gel zweidimensional elektrophoretisch getrennt. Nach dem Anfärben wurden die einzelnen Spots ausgestanzt und die t-RNAs eluiert. Jede t-RNA wurde dann mit jeder Aminosäure auf Peladbarkeit getestet. Ein Gelstück, das keine t-RNA enthält wurde in ein-

t-RNA trennen zu können.

Der Nachteil dieser Methode gegenüber der in ii) beschriebenen besteht darin, daß hier für jede zu testende Aminosäure ein separates Gel gemacht werden muß. Da eine Analyse etwa eine Woche dauert, ist die Methode sehr zeitaufwendig. Dennoch konnten so eine Reihe von t-RNAs identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6. dargestellt.

Für jede getestete Aminosäure wurden die cpm für alle ausgestanzten Gelstücke gemittelt und dann die Standardabweichung berechnet. Lag ein Wert signifikant über dem Mittelwert aller cpm unter Berücksichtigung der Standardabweichung, so wurde die t-RNA als identifiziert betrachtet.

iv) Diese Methode wurde entwickelt mit der Absicht, eine t-RNA radioaktiv zu markieren.

Hierzu wurde die Gesamt-t-RNA erst mit einer "kalten" Aminosäure beladen und dann alle anderen t-RNAs an ihrem 3'-Ende mit Perjodat und tritiiertem Borhydrid markiert. Danach sollte nach der elektrophoretischen Trennung und der Fluorographie des Geles ein Bild erhalten werden, das alle t-RNAs markiert zeigt außer derjenigen, deren vicinale Hydroxylgruppen am 3'-Ende durch die Aminosäure blockiert worden waren.

Es stellte sich jedoch bald heraus, daß zwar die Markierung der t-RNAs durch die Modifizierung mit Perjodat und $^3\text{H-KBH}_4$ ausgezeichnet funktionierte, daß jedoch die Aminoacylierung nicht quantitativ verlief und somit auch der nichtaminoacylierte Anteil der zu identifizierenden t-RNA markiert war. Dadurch war eine Zuordnung einer t-RNA zu ihrer Aminosäure nicht mehr möglich.

Es wurde dann versucht, die t-RNAs nach Beladung mit einer Aminosäure mit Perjodat und "kaltem" Borhydrid zu modifizieren, dann die Aminosäure von der t-RNA zu hydrolysieren und schließlich das somit freigewordene 3'-Ende der zu identifizierenden t-RNA mit Perjodat und

Tabelle 6: Gel mapping durch Trennung aminoacylierter t-RNAs mit radioaktiven Aminosäuren und anschließender Ermittlung der Radioaktivität in den ausgestanzten Gelstücken.

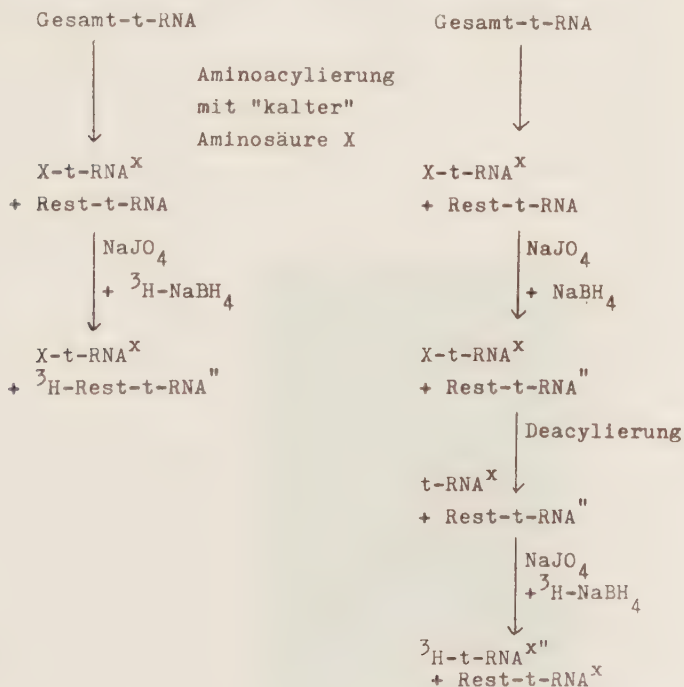
Aminosäure	Arg	Asn	Asp	Glu	His
Spot Nr.					
1	22,6	36,3	39,0	116,0	198,0
2	21,9	28,7	29,0	200,0	187,0
3	24,5	26,0	31,0	279,0	189,0
5		36,4			
7	20,2	27,9		203,0	329,0
8	76,4	24,5	24,0	79,0	325,0
9		56,1			
11	22,2			68,0	425,0
13	20,6	18,4		105,0	245,0
15	21,0	27,1		168,0	394,0
16	23,0	30,6	<u>89,0</u>	124,0	469,0
17		21,4		82,0	347,0
18		22,2		91,0	304,0
19	20,2	15,8	28,0		333,0
20		16,6		113,0	
21	24,3	17,1			
22	22,2	20,4	22,0	104,0	384,0
23	19,0	78,2		111,0	170,0
25	<u>120,7</u>	17,1		149,0	250,0
27			22,0		
28	24,9	34,0	23,0	117,0	<u>1274,0</u>
29	22,2	33,6		135,0	345,0
30	24,9	36,9		131,0	191,0
31	23,6	33,0	25,0	438,0	171,0
32		22,5			
33	42,2	21,4	31,0	161,0	287,0
34	21,1	17,7	25,0	175,0	565,0
35	22,2	19,1		120,0	410,0
36		19,2		100,0	
Mittelwert	23,3	25,5	27,2	133,5	306,7
Standard- abweichung	4,7	10,1	5,1	48,0	107,5

Aminosäure	Ile	Leu	Lys	Met	Pro
Spot Nr.					
1	<u>238,0</u>	24,0	130,0	205,0	3426,0
2	35,0	24,0	96,0	159,0	458,0
3	44,0	24,0	215,0	110,0	
5	28,0				
7	27,0	19,0	128,0	105,0	1343,0
8	22,0	20,0	209,0	144,0	1727,0
9	33,0	41,0			
11	26,0	32,0	113,0	121,0	2815,0
13	29,0	27,0	339,0	166,0	3645,0
15	25,0	22,0	<u>566,0</u>	233,0	833,0
16	27,0	23,0	157,0	156,0	1792,0
17			173,0		1917,0
18			171,0	198,0	4937,0
19	45,0	24,0			<u>209185,0</u>
20		52,0	226,0	204,0	
21	29,0	22,0			18911,0
22	28,0	32,0	195,0	214,0	1564,0
23	24,0	24,0	219,0	118,0	641,0
25	31,0	26,0	149,0	206,0	553,0
27	103,0				
28	24,0	26,0	<u>935,0</u>	173,0	628,0
29	35,0	36,0	166,0	173,0	490,0
30	43,0	23,0	186,0	138,0	387,0
31	23,0	28,0	208,0	108,0	280,0
32					
33	32,0	22,0	217,0	188,0	<u>19988,0</u>
34	30,0	19,0	207,0	238,0	5016,0
35	29,0	21,0	123,0		667,0
36	24,0	28,0	163,0	178,0	457,0
Mittelwert	30,1	25,1	179,5	193,2	1634,9
Standard- abweichung	6,5	5,6	52,4	41,1	1486,2

Aminosäure	Ser	Thr	Tyr	Val
Spot Nr.				
1	47,8	324,0	29,0	300,0
2	<u>125,4</u>	233,0	23,0	120,0
3	20,5	399,0	24,0	258,0
5				
7	38,7	863,0	24,0	282,0
8	22,5	520,0	25,0	474,0
9				
11	18,1	615,0	22,0	264,0
13	22,6	411,0		<u>36496,0</u>
15	23,0	829,0	28,0	206,0
16	22,6	583,0	30,0	709,0
17		168,0		173,0
18		102,0		<u>2348,0</u>
19	22,9		22,0	<u>2973,0</u>
20				<u>13379,0</u>
21		277,0	21,0	
22	22,0	590,0	23,0	417,0
23		464,0	24,0	278,0
25	28,8	638,0	35,0	353,0
27				
28	23,8	<u>1259,0</u>	21,0	163,0
29	25,1	627,0	29,0	247,0
30	27,7	342,0	26,0	371,0
31	23,7	269,0	42,0	203,0
32	22,6			
33		804,0	34,0	559,0
34	23,9	829,0	19,0	238,0
35	24,1		24,0	364,0
36		675,0	18,0	130,0
Mittelwert	25,1	485,2	25,1	294,3
Standard- abweichung	7,0	220,7	5,9	152,1

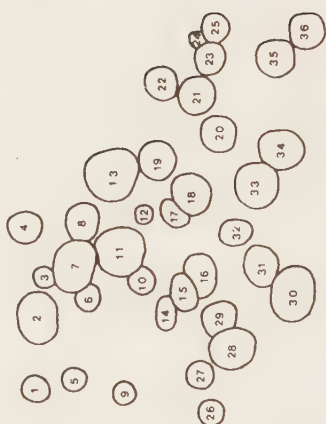
$^3\text{H-KBH}_4$ zu markieren. Hierdurch sollte nun nur die zu identifizierende t-RNA radioaktiv markiert sein, da ja alle anderen t-RNAs zuvor am 3'-Ende mit "kaltem" Borhydrid modifiziert worden waren. Ferner sollte es nicht mehr stören, daß die Aminoacylierung nicht quantitativ verlief, denn der nicht aminoacylierte Anteil sollte vor der Markierung "kalt" modifiziert worden sein. Beide Verfahren sind in Abb. 16. schematisch dargestellt.

Abb. 16: Markierung von t-RNA durch Modifizierung mit Perjodat und tritiiertem Borhydrid.

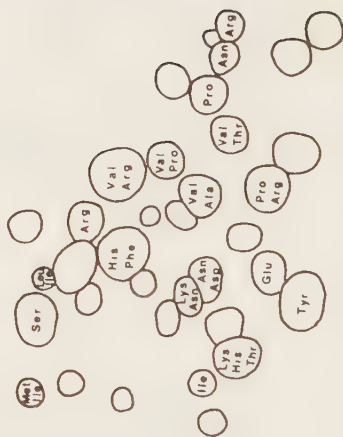


t-RNA'' = Am 3'-Ende modifizierte t-RNA mit Hilfe von Perjodat und Na-Borhydrid.

Abb. 17: Identifizierung spezifischer t-RNAs nach zweidimensionaler Gelelektrophorese



4 A₂₆₀ Gesamt-t-RNA wurden zweidimensional gelelektrophoretisch getrennt. Nach dem Färben wurden die einzelnen Spots durchnummeriert und die darin enthaltenen t-RNAs mit verschiedenen Methoden zu identifizieren versucht.



Leider konnten auch mit diesem Verfahren keine t-RNAs identifiziert werden. Es scheint, daß die t-RNAs eine wiederholte Behandlung mit Perjodat und Borhydrid nicht intakt überstehen.

So mußten für die Identifizierung der Gelmuster die Ergebnisse der Methoden ii) und iii) herangezogen werden. Sie besitzen beide den großen Nachteil, daß die t-RNAs erst nach Ausstanzen des Gelspots identifiziert werden können. Dies ist zuweilen ungenau, vor allem dann, wenn die Spots dicht beieinander liegen. So kann man letztlich nur sagen, daß in dem gekennzeichneten Bereich eine bestimmte t-RNA lokalisiert ist und muß bei der direkten Zuordnung einer t-RNA zu einem Gelspot äußerst vorsichtig sein.

Eine sichere Identifizierung einer t-RNA im Gelpattern ist nur möglich nach Homochromatographie mit einer isolierten radioaktiv markierten t-RNA.

Obwohl längst nicht alle t-RNAs identifiziert werden konnten, zeigt Abb. 17. ein Bild, das zur Orientierung durchaus ausreicht, wobei die gemachten Einwände zu berücksichtigen sind.

4.4. Heterologe Methylierung von t-RNA aus Dictyostelium Discoideum mit einem Enzymextrakt aus E. coli

Reszelbach et al. beschrieben 1977 eine Methode, mit der in eukaryotischen t-RNAs die Spezies aufgefunden werden konnten, die an der Position 54 ein unmodifiziertes Uridin anstelle des normalerweise üblichen Ribothymidins besitzen. Hierzu werden die t-RNAs mit einem angereicherten Extrakt aus E. coli und mit S-Adenosyl-Methionin, das in der Methylgruppe radioaktiv ist, inkubiert, wobei nur das Uridin 54 zu rT 54 umgewandelt wird.

Uns schien diese Methode geeignet, um zu klären, ob

für den beobachteten Abfall der rT-Konzentration im Laufe der Entwicklung von Dictyostelium alle t-RNAs oder nur ganz bestimmte spezifischen t-RNAs verantwortlich sind.

4.4.1. Methylierungsansatz

Eukaryotische t-RNAs sind für das Ribothymidin synthetisierende Enzym aus *E. coli* relativ schlechte Substrate, denn es ist zu erwarten, daß nur wenige t-RNA Spezies ein unmodifiziertes Uridin an der Position 54 enthalten, während der größte Teil an dieser Position die normale Modifikation rT enthält.

Aus diesem Grund war es erforderlich, mit S-Adenosyl-Methionin relativ hoher spezifischer Radioaktivität zu arbeiten. Ferner beinhaltet die *in vitro* Methylierung von t-RNA mit S-Adenosyl-Methionin als Cosubstrat mancherlei Besonderheiten im Vergleich zu anderen enzymatischen Analysen, die den Experimentator vor diverse Schwierigkeiten stellen. So wurde für verschiedene t-RNA-Methylase-Systeme eine Substrathemmung (m^5U ; m^7G), für andere eine Produkthemmung beobachtet. Darüber hinaus liegt der K_m -Wert des Cosubstrates SAM z.T. in der gleichen Größenordnung (ca. $1,5 - 3,0 \times 10^{-6}$ M) wie der K_i -Wert des aus SAM entstehenden Produktes SAH ($0,3 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$ M). Das bedeutet, daß man, um optimale Methylierung zu erreichen, das Cosubstrat SAM in möglichst hoher-, das Substrat t-RNA dagegen in möglichst niedriger Konzentration anbieten sollte.

Wegen der hohen Kosten des tritierten SAM's wurde der Methylierungsansatz bezüglich der SAM-Konzentration und der t-RNA-Konzentration optimiert.

Die Versuche wurden mit Gesamt-t-RNA aus der *E. coli* Mutanten IB-5 (Björk und Isaksson, 1970) durchgeführt. Diesem Stamm fehlt das Ribothymidin synthetisierende Enzym, so daß hier jede t-RNA an der Position 54 ein

unmodifiziertes Uridin enthält.

Die t-RNA wurde mir freundlicherweise von M. Albani zur Verfügung gestellt.

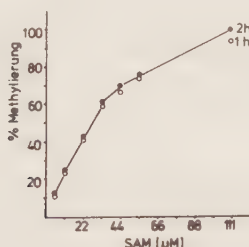
Methyliert wurde in den von R. Raettig (1976) und W. Schmidt (1977) beschriebenen Standardansätzen.

4.4.2. Methylierung in Abhängigkeit von der S-Adenosyl-Methionin Konzentration

0,25 A₂₆₀ IB-5 t-RNA wurden in Ansätzen von 180 µl mit verschiedenen Konzentrationen von radioaktiv markiertem SAM methyliert. 50 µl wurden nach einer- und nach zwei Stunden Inkubationszeit bei 37°C entnommen, auf Whatman 3MM Filterplättchen pipettiert und nach dem Waschen in Toluol Szintillator gezählt.

Abb. 18. zeigt die eingebaute Radioaktivität in Abhängigkeit von der SAM Konzentration. Der höchste Wert wurde gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

Abb. 18: Methylierung von Gesamt-t-RNA aus E. coli IB-5 in Abhängigkeit von der SAM-Konzentration.



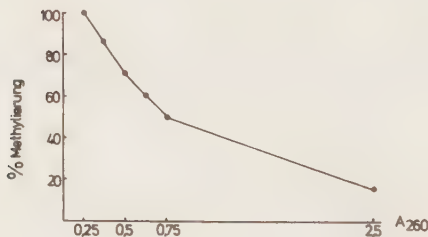
Je 0,25 A₂₆₀ IB-5 t-RNA wurden mit einem Enzymextrakt aus E. coli (siehe 3.6.2.) und verschiedenen Konzentrationen von SAM eine bzw. zwei Stunden lang methyliert. Die höchsten Werte wurden gleich 100% gesetzt und alle anderen darauf bezogen.

Für die Methylierung von t-RNA aus Dictyostelium wurde eine SAM-Konzentration von 48 uM pro Ansatz gewählt, die nach dieser Analyse etwa 75% Methylierung gestatten sollte.

4.4.3. Methylierung in Abhängigkeit von der t-RNA Konzentration

In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Mengen t-RNA mit jeweils 111 uM SAM methyliert. Abb 19. zeigt die eingebaute Radioaktivität (%) in Abhängigkeit von der eingesetzten t-RNA Menge, wobei auch hier wieder der höchste Wert für C,25 A₂₆₀ t-RNA gleich 100% gesetzt wurde.

Abb. 19: Methylierung von Gesamt-t-RNA aus E. coli IB-5 in Abhängigkeit von der t-RNA Konzentration.



Verschiedene Mengen t-RNA wurden bei 37°C mit jeweils 111 uM SAM und einem Enzymextrakt aus E. coli methyliert. Der höchste Wert eingebaute Radioaktivität entsprechend einer t-RNA Menge von 0,25 A₂₆₀ wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

Die Ansätze für die heterologe Methylierung von t-RNA aus *Dictyostelium* enthielten $0,5 A_{260}$ t-RNA. Hierbei wird die t-RNA zu etwa 75% methyliert (siehe Abb. 19.).

Aus diesen Vorversuchen läßt sich schließen, daß bei heterologer Methylierung von t-RNA aus *Dictyostelium* in einem Ansatz mit $0,5 A_{260}$ t-RNA und einer SAM-Konzentration von $48 \mu\text{M}$ maximal 56% der t-RNA methyliert werden. Dies setzt voraus, daß die heterologe t-RNA aus *Dictyostelium* ein ebenso gutes Substrat für das *E. coli* Enzym ist, wie die IB-5 t-RNA.

Die Bedingungen der Methylierung von t-RNA aus *Dictyostelium* sind danach nicht optimal. Dennoch ist die Methode geeignet, um t-RNAs mit einem Uridin an der Position 54 zu ermitteln. Eine quantitative Auswertung ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

4.4.4. Produktanalyse

Sollen rT-defiziente t-RNAs in *Dictyostelium* durch die beschriebene Methode (4.4.) nachgewiesen werden, so muß geprüft werden, ob bei der heterologen Methylierung als einziges Produkt Ribothymidin entsteht.

Hierzu wurden je $0,5 A_{260}$ t-RNA aus vegetativen- und aus Preaggregationszellen (14 Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt) methyliert (3.8.). Anschließend wurden die t-RNAs nach Rogg (3.9.2.) zu Nukleosiden verdaut und die Produkte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie getrennt.

Abb. 20. zeigt das Fluorogramm dieser Analyse von t-RNA aus vegetativen Zellen. Nur Ribothymidin ist radioaktiv markiert was beweist, daß das Enzym aus *E. coli* unter den beschriebenen Bedingungen ausschließlich ein Uridin in der t-RNA aus *Dictyostelium* in ein Ribothymidin umwandelt. Die Analyse der t-RNA aus Preaggregationszellen zeigte das gleiche Resultat.

Abb. 20: Nukleosidanalyse von t-RNA aus Dictyostelium nach heterologer Methylierung mit einem Enzymextrakt aus E. coli und ^{14}C -markiertem SAM.



0,5 A₂₆₀ t-RNA aus vegetativen- und Preaggregationszellen von Dictyostelium wurden mit einem Enzymextrakt aus E. coli und ^{14}C -markiertem SAM methyliert (3.8.). Die t-RNAs wurden deproteinisiert, entsalzt und nach Rogg zu Nukleosiden verdaut (3.9.2.). Diese Nukleoside wurden dann dünnenschichtchromatographisch zweidimensional getrennt. Entwickelt wurden die Chromatogramme in Fließmittel C in der ersten Dimension und Fließmittel D in der zweiten Dimension. Die Hauptbasen wurden durch UV-Anregung bei 254 nm, die Radioaktivität durch Fluorographie ermittelt. In beiden untersuchten t-RNAs war nur das Ribothymidin radioaktiv markiert.

4.4.5. U 54 t-RNAs aus vegetativen Zellen und aus Zellen des Preaggregationsstadiums von Dictyostelium Discoideum

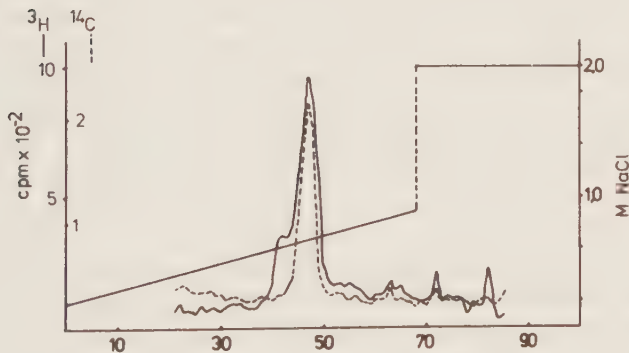
Um zu klären, ob das Muster der t-RNAs, die an der Position 54 ein Uridin enthalten, verschieden ist in vegetativen Zellen und in Zellen aus dem Preaggregationsstadium, wurden zwei Methoden angewandt:

- a) die RPC-5-Chromatographie
- b) die zweidimensionale Polyacrylamidgel Elektrophorese.

a) RPC-5-Chromatographie.

In zwei getrennten Ansätzen wurden je 0,5 A₂₆₀ vegetative t-RNA und Preaggregations-t-RNA methyliert (3.8.). Für die vegetative t-RNA diente ¹⁴C-markiertes SAM, für die Preaggregations-t-RNA ³H-markiertes SAM als Methylgruppendonator. Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden die Ansätze auf 0,25 M NaCl eingestellt und direkt auf eine RPC-5 Säule gegeben.

Abb. 21: RPC-5-Chromatographie heterolog methylierter t-RNAs aus Dictyostelium.



Vegetative t-RNA wurde mit ¹⁴C-SAM, Preaggregations-t-RNA mit ³H-SAM als Methylgruppendonator heterolog methyliert (3.8.). Beide Ansätze wurden vereinigt und die t-RNAs auf einer RPC-5-Säule getrennt. Alle Fraktionen wurden mit dem gleichen Volumen an 20%iger TCA versetzt, die gefällten t-RNAs abfiltriert und die Radioaktivität gezählt.

Abb. 21. zeigt das Elutionsprofil dieser Doppelmarkierung. Während der größte Teil der ^{14}C - und der ^3H -Radioaktivität kongruent eluiert werden, zeigt das Profil der Preaggregations-t-RNA bei den Fraktionen 41 bis 45 eine deutliche Schulter, die bei der vegetativen t-RNA fehlt. Dies deutet darauf hin, daß in diesem Bereich eine Preaggregations-t-RNA eluiert wurde, die an der Position 54 ein Uridin enthält, während in der vegetativen t-RNA entweder diese t-RNA ganz fehlt oder aber an der Position 54 voll zu Ribothymidin modifiziert ist.

b) Zweidimensionale Polyacrylamidgel Elektrophorese.

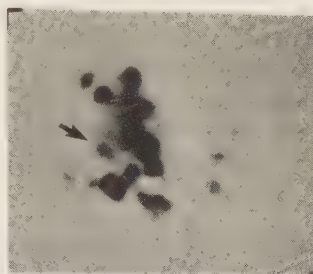
Je 1 A_{260} t-RNA aus vegetativen Zellen und aus Zellen des Preaggregationsstadiums wurden in getrennten Ansätzen mit ^3H -SAM methyliert (siehe 3.8.). Die aus den Reaktionsgemischen zurückgewonnenen t-RNAs wurden auf zwei separaten Polyacrylamidgelen zweidimensional getrennt (3.12.). Die Gele wurden dann für die Fluorographie präpariert (3.12.2.), in Methylenblau gefärbt und getrocknet. Anschließend wurden sie bei -80°C auf Kodak X-Omat Röntgenfilmen drei Tage lang exponiert.

Die Abb. 22. a) und b) zeigen die Fluorogramme dieser beiden Analysen. Jeder radioaktiv markierte Fleck repräsentiert mindestens eine spezifische t-RNA mit einem unmodifizierten Uridin an der Position 54. Die Fluorogramme beider Analysen sind mit einigen Ausnahmen identisch. Einmal sind einige t-RNA Spezies unterschiedlich stark markiert. Der auffallenste Unterschied ist jedoch durch den Pfeil gekennzeichnet. In der t-RNA Präparation aus dem Preaggregationsstadium ist eine t-RNA-Spezies zusätzlich markiert. Da sich aber in beiden Gelen an dieser Position eine mit Methylenblau anfärbbare t-RNA findet, kann geschlossen werden, daß die vegetative t-RNA ein rT 54 enthält, dem im Präaggregationsstadium in Position 54 ein Uridin entspricht.

Abb. 22: Zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese heterolog methylierter t-RNAs aus *Dictyostelium Discoideum*

a)

b)



Je 1 A₂₆₀ t-RNA aus vegetativen Zellen (a) und aus Zellen des Preaggregationsstadiums (b) wurden mit ³H-SAM und einem Enzymextrakt aus *E. coli* methyliert. Die t-RNAs wurden anschließend zweidimensional elektrophoretisch getrennt und die Radioaktivität in den Gelen durch Fluorographie ermittelt. Zusätzlich wurden die Gele mit Methyleneblau gefärbt, um auch die nicht markierten t-RNAs sichtbar zu machen. Es sind nur die Fluorogramme der markierten t-RNAs gezeigt; die mit Methyleneblau gefärbten Gele entsprachen der Abb. 16.

Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei dieser t-RNA und bei der t-RNA, die in der Schulter im RPC-5-Profil (siehe Abb. 21.) eluiert wurde, um eine Asparagin akzeptierende t-RNA handelt. Sie ist identisch mit dem von Palatnik et al. (1977) beschriebenen Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₂.

Aus der Arbeit von Palatnik et al. (1977) war bekannt, daß während der frühen Phase der Entwicklung von Dictyostelium die Menge an t-RNA^{Asn}₂ ansteigt, gleichzeitig jedoch der Gehalt an t-RNA^{Asn}₃ abnimmt. Von den Autoren wurde spekuliert, daß eventuell posttranskriptionelle Modifikationen für die Verschiebung der Mengen dieser Isoakzeptoren verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang wurde für t-RNA^{Asn}₂ das Vorkommen der Hypermodifikation Q diskutiert.

In den folgenden Versuchen wurden drei Fragen bezüglich der t-RNA^{Asn}₂ studiert:

- i.) Wird t-RNA^{Asn}₂ während der frühen Phase der Entwicklung von Dictyostelium Discoideum neu synthetisiert oder geht sie aus t-RNA^{Asn}₃ durch Einführen einer neuen Modifikation hervor?
- ii.) Enthält t-RNA^{Asn}₂ an der Position 54 ausschließlich ein Uridin oder teils Uridin, teils Ribothymidin und gehört damit zu der von Roe et al. (1977) beschriebenen Klasse C der t-RNAs?
- iii.) Enthält t-RNA^{Asn}₂ die Hypermodifikation Q?

4.5.1.

Neusynthetisierte t-RNAs während des vegetativen Wachstums und während der Preaggregation von Dictyostelium Discoideum

Die t-RNAs wurden in vivo mit ³²P markiert. Um die spezifische Radioaktivität des ³²P nicht zu stark durch endogenes Phosphat zu verdünnen, wurden vegetative Zellen in einem Phosphat-armen "MES-HL-5 Medium" gezüchtet oder während der Preaggregationsphase in "FES-PDF Puffer" geschüttelt (3.2.4.).

Die während des vegetativen Wachstums synthetisierten t-RNAs wurden markiert, indem über zwei Generationen

dem Medium 2,5 mCi ^{32}P zugesetzt wurde.

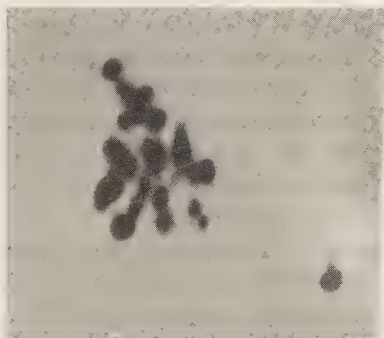
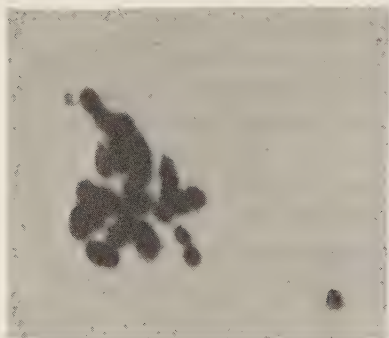
Um die während der frühen Preaggregation synthetisierten t-RNAs zu ermitteln, wurden die Zellen in MES-HL-5 Medium gezüchtet und dann 14 Stunden in MES-PDF Puffer unter Zusatz von 2,5 mCi ^{32}P geschüttelt.

Abb. 23. zeigt die Autoradiogramme der t-RNAs beider Stadien nach Trennung durch zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Abb. 23: In vivo mit ^{32}P markierte t-RNAs aus vegetativen Zellen und aus Zellen der Preaggregationsphase

a)

b)



Dictyostelium Discoideum wurde in einer 20 ml Kultur in einem phosphatarmen "MES-HL-5 Medium" bis zu einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml gezüchtet. Danach wurde der Organismus über zwei Generationen mit 2,5 mCi ^{32}P markiert. Die isolierten t-RNAs wurden dann zweidimensional elektrophoretisch getrennt (a).

Eine zweite Kultur wurde bis zu einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml in dem gleichen phosphatarmen Medium gezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 7 ml "MES-PDF Puffer" resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 mCi ^{32}P wurden sie 14 Stunden geschüttelt. Die t-RNA wurde isoliert und ebenfalls elektrophoretisch getrennt (b).

Alle durch diese Methode trennbaren t-RNAs werden sowohl während des vegetativen Wachstums als auch unmittelbar nach Einsetzen der Entwicklung neu synthetisiert. Dies ist bemerkenswert, denn einerseits vermehrt sich der Organismus nach Beginn der Entwicklung nicht mehr, andererseits haben eukaryontische t-RNAs verschiedener Herkunft eine durchschnittliche Halbwertszeit von etwa 60 Stunden (Schlegel et al. 1978). Der gesamte Entwicklungszyklus dauert jedoch nur 24-26 Stunden. Demnach könnte die vorhandene Menge an t-RNA aus der vegetativen Phase auch für die Entwicklung ausreichen. Daß die t-RNAs während der frühen Entwicklung nicht nur transkribiert sondern auch modifiziert werden, konnte durch in vivo-Markierung mit tritiiertem Methionin in unserem Arbeitskreis durch M. Mach gezeigt werden (Dingermann et al., 1979).

Diese Ergebnisse zeigen, daß t-RNA₂^{Asn} wie alle anderen zu ermittelnden t-RNAs während der frühen Entwicklungsstadien von Dictyostelium neu synthetisiert werden. Der zu beobachtende Anstieg in der Menge an t-RNA₂^{Asn} resultiert zumindest nicht ausschließlich daraus, daß mit Einsetzen der Entwicklung die vorhandene Menge an t-RNA₃^{Asn} durch posttranskriptionelle Modifizierung umgewandelt wird in t-RNA₂^{Asn}.

4.5.2. Welches Nukleosid findet sich an der Position 54 in der t-RNA₂^{Asn}?

Die t-RNA₂^{Asn} läßt sich mit dem Ribothymidin synthetisierenden Enzym aus E. coli und SAM methylieren (4.4.5.), d.h., daß sie an ihrer Position 54 Uridin enthält. Es sind t-RNA Spezies bekannt, die an der Position 54 nicht vollständig untermodifiziert sind; sie haben teils unmodifiziertes Uridin, teils Ribothymidin an dieser Position (Keith et al., 1973, Roe und Tsen, 1977). Von diesen t-RNAs wird vermutet, daß sie regulatorische Funktionen bei der Proteinbiosynthese haben, denn in vitro-Experimente mit Phenylalanin-spezifischen t-RNAs

mit unterschiedlichen prozentualen Verhältnissen rT/U zeigten eine deutliche Korrelation des rT Gehaltes mit mit der Geschwindigkeit der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese (Roe und Tsen, 1977).

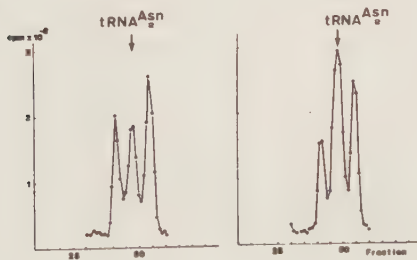
4.5.2.1. Isolierung von t-RNA^{Asn}₂

Die ³²P markierte t-RNA^{Asn}₂ wurde nach der zweidimensionalen Trennung an Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aus dem Gel eluiert (3.12.3.).

Da der Fleck jedoch nicht homogen erschien, wurde die t-RNA durch RPC-5 Chromatographie nachgereinigt.

Abb. 24. zeigt die Chromatogramme der vegetativen t-RNA^{Asn}₂ und der t-RNA^{Asn}₂ aus dem Präaggregationsstadium.

Abb. 24: Chromatographische Reinigung der aus dem Polyacrylamidgel eluierten t-RNA^{Asn}₂ aus dem vegetativen- und dem Präaggregationsstadium an RPC-5 Säulen.



Die elektrophoretisch eluierte t-RNA^{Asn}₂ aus dem vegetativen Stadium (a) und aus dem Präaggregationsstadium (b) wurden getrennt auf eine RPC-5 Säule aufgezogen und mit einem linearen NaCl-Gradienten (500 ml; 0,25 M - 1,1 M) mit 1,5 ml/min eluiert.

Diese Analyse erlaubte folgende Aussagen:

- i.) Der Gelfleck, in dem sich die t-RNA^{Asn}₂ findet, enthält zusätzlich zwei weitere t-RNA Spezies.
- ii.) Wie zu erwarten war, ist die relative Menge an t-RNA^{Asn}₂ während der Preaggregation erhöht.
- iii.) Die t-RNA^{Asn}₂ findet sich in der mittleren Position des inhomogenen Gelflecks.

4.5.2.2. Fingerprintanalyse nach Sanger (Brownlee und Sanger, 1967)

Die Frage, ob die gesuchte t-RNA an der Position 54 ausschließlich ein Uridin enthält oder zum Teil zu Ribothymidin methyliert ist, ist nicht einfach zu klären. Bei einer totalen Hydrolyse ließe sich in rT-haltigen t-RNAs zwar ein Ribothymidin nachweisen, jedoch kann so nicht das gleichzeitige Vorkommen von Uridin an dieser Position ermittelt werden.

Werden die t-RNAs mit spezifischen Endonukleasen gespalten und dann durch Hochspannungselektrophorese getrennt, so ergibt jede t-RNA ein spezifisches Oligonukleotidmuster, den sog. "Fingerprint".

Die Endonuklease T₁ spaltet immer nach einem Guanosin, sodaß jedes Oligonukleotid am 3'-Ende ein G enthält. Die Schleife 4 in der t-RNA weist in den Positionen 53-57 eine Homologie in der Sequenz auf, nämlich die Basenfolge GT~~U~~CG. Liegt diese Sequenz vor, so entsteht bei der Verdauung der t-RNA mit Ribonuklease T₁ ein Tetranukleotid der Sequenz T~~U~~CG. Allerdings besitzen manche t-RNAs an der Position 57 ein A, so daß in diesem Falle ein größeres Oligonukleotid bei der T₁ Spaltung entsteht.

Das Tetranukleotid T~~U~~CG wird nun aus der DEAE-Zellulose eluiert, mit Ribonuklease T₂ zu 3'-Nukleotiden verdaut und die Nukleotide getrennt. Findet sich an der Position 54 sowohl U als auch rT, so zeigt das Chromatogramm die Nu-

Abb. 25: Fingerprintsanalyse auf Glas von ...



Legende zu Abb. 25:

Die aus dem Polyacrylamidgel eluierten und durch RPC-5 Chromatographie nachgereinigten t-RNAs wurden mit RNAase T₁ gespalten und die erhaltenen Fragmente nach Sanger (1967) durch Hochspannungselektrophorese getrennt. Die Trennung in der 1. Dimension erfolgte auf Zelluloseacetatstreifen bei pH 3,5 mit 2700 Volt. Die Oligonukleotide wurden auf DEAE-Papier übertragen und in der 2. Dimension in 7% Ameisensäure mit 800 Volt getrennt. Nach Autoradiographie wurde das Oligonukleotid, das die Basen 54-57 in der t-RNA enthielt, aus der DEAE-Zellulose eluiert und mit Ribonuklease T₂ zu 3'-Nukleotiden verdaut. Diese wurden dann nach Nishimura auf Zellulose DC-Platten in Fließmittel E in der 1. Dimension und Fließmittel F in der 2. Dimension getrennt.

Abb. 25. zeigt die Fingerprints der t-RNAs in der Reihenfolge ihrer Elution von der RPC-5 Säule. Da die entsprechenden t-RNAs aus dem vegetativen Stadium und aus der Preaggregation gleiche Oligonukleotidmuster ergaben, sind hier nur die Bilder aus der vegetativen Phase gezeigt.

kleotide G; C; $\emptyset$; rT und U.

Abb. 25. zeigt die Oligonukleotidmuster der drei t-RNAs in der Reihenfolge ihrer Elution von der RPC-5 Säule.

Der Pfeil deutet auf das Tetranukleotid 54-57.

Die Analyse ergab, daß die entsprechenden t-RNAs aus beiden Stadien identische Fingerprints besitzen. Ferner enthält die 1. t-RNA in der bezeichneten Region kein Tetranukleotid und damit an der Position 57 kein G sondern wahrscheinlich ein A. Die eluierten Tetranukleotide der t-RNAs II und III zeigten folgende Nukleotidzusammensetzung:

t-RNA II: rT/U; $\emptyset$; C; G.

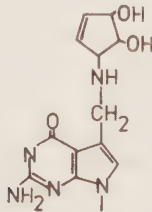
t-RNA III: rT; $\emptyset$; C; G.

Daraus folgt, daß die t-RNA^{Asn}₂ zu der Klasse von t-RNAs gehört, die an der Position 54 Uridin enthält, das zum Teil zu Ribothymidin modifiziert ist.

4.5.3. Enthält die t-RNA^{Asn}₂ die Hypermodifikation Q?

Das Vorhandensein der Hypermodifikation Q in der t-RNA^{Asn}₂ wurde indirekt analysiert. Das Prinzip ist bei Wosnik und White (1979) beschrieben und beruht auf folgender Überlegung:

Die Modifikation Q hat die Struktur:



7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosine

Wird dieses Nukleosid mit Na-metaperjodat an der cis-Diolgruppierung im Cyclopentendioldiolring oxidiert, so verliert die Base ihre relativ hohe Hydrophilie. Dieser Effekt ist so groß, daß die so modifizierte t-RNA bei einer RPC-5 Chromatographie wesentlich später eluiert wird, als die nicht modifizierte t-RNA.

Da die RPC-5 Trennung von Analyse zu Analyse nicht völlig reproduzierbar ist, wurde die Untersuchung als Doppelmarkierung durchgeführt. Hierzu wurde die Gesamt-t-RNA einmal mit ¹⁴C-Asparagin und einmal mit ³H-Asparagin aminoacyliert. Die mit Tritium markierte t-RNA wurde mit Na-metaperjodat modifiziert (3.14.), die mit ¹⁴C markierte Probe diente als Kontrolle.

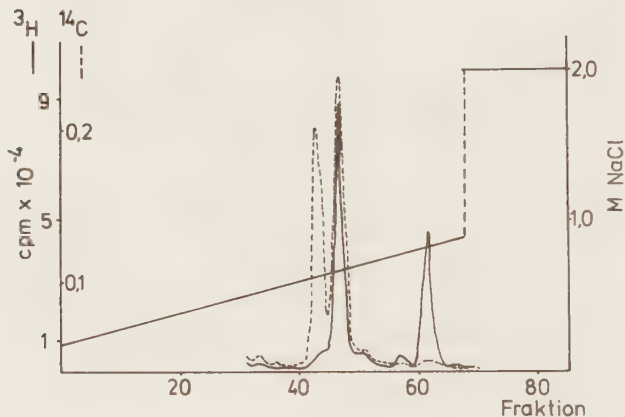
Abb. 26. zeigt das Chromatogramm für die vegetative t-RNA. In dieser Analyse wird der ³H-markierte Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₂ bei höheren Salzkonzentrationen eluiert als

der mit ^{14}C -markierte Isoakzeptor $\text{t-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$. Das gleiche Resultat wurde auch für die $\text{t-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ aus dem Preaggregationsstadium erhalten.

Die Analyse zeigt, daß die $\text{t-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ aus beiden untersuchten Stadien des Lebenszyklus von Dictyostelium die hypermodifizierte Base Q enthält, während im Isoakzeptor $\text{t-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ diese Modifikation nicht vorhanden ist.

Ob sich die Isoakzeptoren $\text{t-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ und $\text{t-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ nur in dieser Modifikation unterscheiden, kann mit dieser Analyse nicht gezeigt werden.

Abb 26: Nachweis der Hypermodifikatin Q in der $\text{t-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$.



Gesamt-t-RNA wurde einmal mit ^{14}C -Asn und einmal mit ^3H -Asn aminoacyliert. Die tritiierte Probe wurde mit Na-metaperjodat modifiziert und dann beide Proben gemeinsam auf einer RPC-5 Säule getrennt. Jede Fraktion wurde mit dem gleichen Volumen an 20%iger TCA versetzt und die gefällten t-RNAs abfiltriert. Anschließend wurde die Radioaktivität gezählt.

- 4.6. Verteilung von t-RNAs mit einem Ribothymidin an der Position 54 und t-RNAs mit einem U 54 im Gesamtzellextrakt und an den Polysomen

Nach einer Hypothese von Erdmann et al. (1973) soll die T ψ CG Sequenz für die Bindung der t-RNAs am Ribosom mitverantwortlich sein. Bei Prokaryonten findet sich nämlich in der 5S-rRNA eine zu dieser Sequenz komplementäre Nukleotidfolge (Ofengand und Henes, 1969), die in der 5,8S-rRNA des eukaryontischen Ribosoms sogar mehrfach auftritt (Erdmann, 1976). Demnach sollten Veränderungen in dieser Sequenz der t-RNA die Bindungsfähigkeit der t-RNA an das Ribosom beeinflussen.

Diese Hypothese wird durch Experimente von Roe et al. (1978) gestützt: Mit spezifischen eukaryontischen Phenylalanin-t-RNAs, die sich im Verhältnis rT/U in der Position 54 unterscheiden, ist die Poly-U-abhängige Polyphenylalaninsynthese streng mit dem Gehalt der t-RNA an rT korreliert.

Mit dem Schleimpilz Dictyostelium Discoideum sollte untersucht werden, ob sich diese in vitro-Befunde auch in vivo zeigen lassen könnten.

Folgende Arbeitshypothese lag diesen Untersuchungen zu Grunde:

Vorausgesetzt, daß die T ψ CG Sequenz einer t-RNA eine höhere Affinität zum Ribosom hat, als die U ψ CG Sequenz, so sollten rT-haltige t-RNAs bevorzugt an Polysomen vorkommen. Dies sollte vor allem für die t-RNAs zutreffen, die an Position 54 teils U und teils rT enthalten, wenn die rT-haltigen t-RNAs bevorzugt an der Proteinbiosynthese beteiligt wären.

Die Analyse umfaßte folgende Einzelschritte:

- 1.) Isolierung von Polysomen aus vegetativen Zellen und aus Zellen des Preaggregationsstadiums

- ii.) Isolierung der Gesamt-t-RNAs aus den Zellen und aus der Polysomenfraktion.
- iii.) Heterologe Methylierung dieser t-RNAs mit dem rT-synthetisierenden Enzym aus *E. coli* und ^3H -SAM als Cosubstrat.
- iv.) Zweidimensionale Trennung dieser heterolog methylierten t-RNAs an Polyacrylamidgelen.

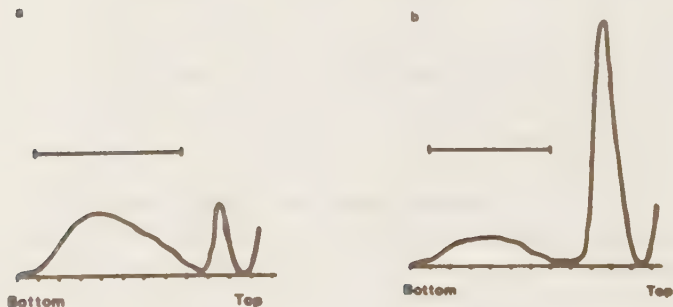
4.6.1. Isolierung von Polysomen

Die Methode der Polysomenisolierung ist in 3.10. beschrieben.

Abb 27. zeigt das optische Profil nach Trennung über einen linearen Saccharosegradienten. Die gekennzeichneten Fraktionen wurden gesammelt und mit Äthanol gefällt.

Man erkennt deutlich, daß nach Einsetzen der Entwicklung ein großer Teil der Polysomen zerfällt, wodurch der Gehalt der Monosomen stark zunimmt (Iodish et al., 1976).

Abb. 27: Polysomenprofil aus vegetativen Zellen (a) und aus Zellen des Preaggregationsstadiums



Vegetative Zellen und Zellen des Preaggregationsstadiums wurden aufgeschlossen und die Polysomen durch Zentrifugation in einem Saccharosegradienten isoliert (3.10.).

4.6.2. Isolierung der t-RNAs aus der Polysomenfraktion und aus den Zellen

Die Polysomen bzw. die Zellextrakte wurden mit Phenol/SDS deproteinisiert. Nach DEAE-Zellulosechromatographie wurden die RNAs mit Ethanol gefällt und anschließend auf Sephadex G 100 Säulen aufgetrennt.

Abb. 27. zeigt das Isolierungsschema von polysomaler- und Gesamt-t-RNA.

Etwa 20% der Gesamt-t-RNA der Zellen war mit den Polysomen assoziiert.

Legende zu Abb. 27:

Dictyostelium Discoideum wurde bei einer Zellzahl von $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml aufgeschlossen. Aus einem Teil wurden Polysomen durch Saccharose-Gradientenzentrifugation isoliert. Zellextrakt und Polysomen wurden phenolisiert, über DEAE-Zellulose Säulen die RNA isoliert und anschließend die t-RNA durch Sephadex G 100 Chromatographie gewonnen. Die Pfeile im Sephadex G 100 Chromatogramm deuten die gesammelten t-RNA Fraktionen an.

Zellen

Aufschluß

Gesamtzell
t-RNA



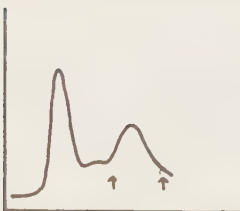
Phenolisierung



DEAE Cellulose
Chromatographie



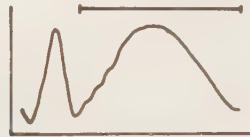
Sephadex G100
Chromatographie



Polysomale
t-RNA



Polysomenisolierung



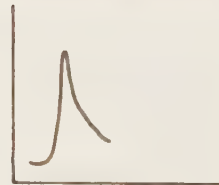
Äthanol-fällung



Phenolisierung



DEAE Cellulose
Chromatographie



Sephadex G100
Chromatographie



4.6.3. Heterologe Methylierung von polysomaler- und Gesamtzell-t-RNA

Um vergleichende Aussagen machen zu können, wurden die Methylierungen von Gesamtzell- und polysomaler t-RNA sowohl aus dem vegetativen Stadium als auch aus dem Preaggregationsstadium parallel und unter genau den gleichen Bedingungen ausgeführt.

In je zwei Ansätzen wurde von jeder t-RNA 1 A₂₆₀ methyliert (3.8.).

In wiederholten Experimenten mit verschiedenen t-RNA Präparationen wurden die t-RNAs in folgendem Ausmaß methyliert:

	pmol rT/A ₂₆₀ t-RNA	
	vegetative t-RNA	Präaggregations-t-RNA
t-RNA aus dem Gesamtzellextrakt	110	115
t-RNA aus den Polysomen	60	70

Wie in Kapitel 4.4.3. gezeigt werden konnte, verläuft die Methylierungsreaktion unter den angewendeten Bedingungen nicht bis zum Ende. Dennoch sind in jedem Fall die polysomalen t-RNAs signifikant weniger methylierbar und enthalten demnach mehr Ribothymidin als die Gesamt-t-RNAs der Zelle.

4.6.4. Trennung der methylierten t-RNAs durch zweidimensionale Polyacrylamidgel Elektrophorese

Auch diese Experimente wurden für alle zu testende t-RNAs parallel, unter völlig gleichen Bedingungen ausgeführt. Je 1 A₂₆₀ von jeder t-RNA wurde elektrophoretisch getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und nach Behandlung mit DMSO/PPO (3.12.2.) drei Tage lang bei -80°C auf Röntgenfilmen exponiert.

Die mit Ethidiumbromid gefärbten Gele zeigen alle trennbaren t-RNAs, die Fluorographien nur die heterolog methylierbaren t-RNAs.

Folgende Aussagen lassen sich nach diesen Analysen machen:

- 1.) Die mit Ethidiumbromid gefärbten Gele zeigen keine Unterschiede zwischen den t-RNAs aus dem vegetativen- und aus dem Preaggregationsstadium.
- 2.) Unterschiede zwischen t-RNAs aus Polysomen und aus der Gesamtzelle sind zu erkennen. An den Polysomen tritt eine t-RNA auf, die in der Gesamtzell-t-RNA nicht zu ermitteln ist (siehe Pfeil w). Ob diese t-RNA ausschließlich an den Polysomen vorkommt oder ob sie im Cytoplasma in einer anderen Form vorliegt und deshalb im Gel ein anderes Laufverhalten zeigt, muß weiter untersucht werden. Intensitätsunterschiede in der Färbung weisen darauf hin, daß die Verteilung der t-RNAs am Polysom nicht genau der im Gesamtzellextrakt entspricht (siehe Pfeil v).
- 3.) Die Fluorogramme zeigen, daß die polysomalen t-RNAs deutlich weniger Methylgruppen akzeptieren als die t-RNAs aus dem Zellextrakt.

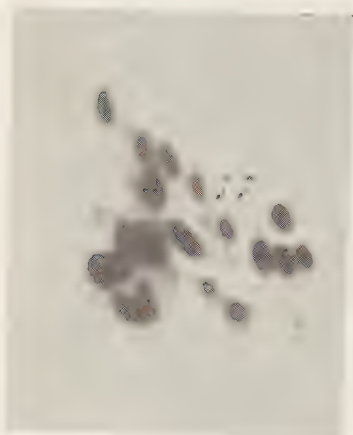
Das bedeutet, daß an den Polysomen Ribothymidin-haltige t-RNAs akkumulieren, während im Gesamt-zellextrakt eine große Menge t-RNAs mit einem unmodifizierten Uridin an der Position 54 vor-liegt.

- 4.) Die in Abb. 29. mit x und y gekennzeichneten t-RNAs zeigen vergleichbare Intensitäten in ihrer Methylierbarkeit. Das gilt für t-RNA aus Polysomen und aus dem Gesamtzellextrakt. Dies deutet darauf hin, daß diese t-RNAs zu der Klasse gehören, die an der Position 54 ausschließlich ein unmodifiziertes Uridin ent-halten. Sie wurde von Roe et al. (1977) als Klasse D bezeichnet.
- 5.) In polysomaler- und in Gesamtzell-t-RNA des Preaggregationsstadiums findet sich deutlich die t-RNA^{Asn}₂ (siehe Pfeil z), die in der ve-getativen t-RNA in keinem der beiden Kompar-timente methyliert ist.

Da bei jeder Analyse genau 1 A₂₆₀ methyliert und elek-trophoretisch aufgetrennt wurde, zeigen diese Experimen-te, daß von den t-RNAs, in denen an der Position 54 teils Uridin, teils Ribothymidin vorkommt, der Anteil, der Ribothymidin enthält, hauptsächlich zur Proteinbio-synthese verwendet wird. Zwar sind die t-RNAs mit einem Uridin an der Position 54 auch an der Proteinbiosynthese beteiligt, jedoch findet sich der größte Teil frei im Cytoplasma und nur ein sehr geringer Teil an den Polysomen.

Abb. 99: Muster heterolog methylierter t-RNAs nach
Färbung mit Ethidiumbromid

a)



b)



c)



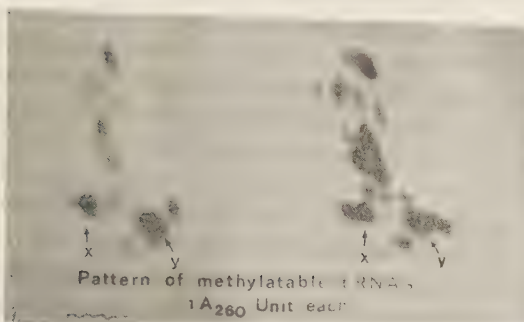
d)



Abb. 29: Muster heterolog methylierter t-RNAs nach Fluorographie.

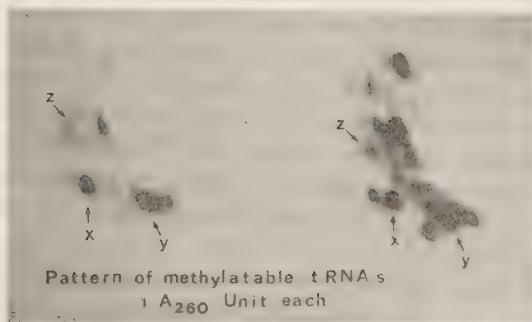
a)

b)



c)

d)



Legende zu den Abb. 28. und 29.:

Je 1 A₂₆₀ polysomale- und Gesamtzell-t-RNA aus dem vegetativen Stadium und aus Zellen des Preaggregationsstadiums wurden mit ³H-SAM und dem Ribothymidin-synthetisierenden Enzym aus E. coli methyliert (3.8.).

Nach der Trennung der t-RNAs durch zweidimensionale Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt (Abb. 28.) und anschließend die eingebaute Radioaktivität durch Fluorographie ermittelt (Abb. 29.).

In beiden Abbildungen entspricht:

- a) Polysomale t-RNA aus dem vegetativen Stadium
- b) Gesamtzell-t-RNA aus dem vegetativen Stadium
- c) Polysomale t-RNA aus dem Preaggregationsstadium
- d) Gesamtzell-t-RNA aus dem Preaggregationsstadium

Der Pfeil v deutet auf eine t-RNA Spezies, die sich mit unterschiedlicher Intensität anfärben läßt in polysomaler- und Gesamtzell-t-RNA.

Die mit w bezeichnete t-RNA scheint nur an den Polysomen vorhanden zu sein.

Fast alle methylierbaren t-RNAs sind im Cytoplasma stärker markierbar als an den Polysomen. Ausnahmen machen die t-RNAs x und y, die in beiden Kompartimenten gleich stark methylierbar sind. Dies deutet darauf hin, daß sie ausschließlich an der Position 54 ein Uridin enthalten, während bei den anderen t-RNAs an dieser Position wahrscheinlich zum Teil Uridin, zum Teil Ribothymidin vorkommen.

Die mit z bezeichnete t-RNA ist t-RNA₂^{Asn}, die nur in t-RNA aus dem Preaggregationsstadium methylierbar ist.

4.7. Bestimmung des Beladungszustands der
t-RNAs von Dictyostelium Discoideum
in vivo

Die verschiedenen Stadien der Entwicklung von Dictyostelium Discoideum werden durch Nahrungsentzug eingeleitet. Während dieser Entwicklung läuft die Proteinbiosynthese nur noch mit etwa 30% der Geschwindigkeit wie in vegetativen Zellen (Alton und Lodish, 1977). Das Medium besteht im wesentlichen aus Vitaminen, Aminosäuren und einer Kohlenstoffquelle (Glukose oder Maltose). Marin hat 1976 gezeigt, daß die Entwicklung vor allem durch Entzug von Aminosäuren induziert wird. 1976 beobachtete Lodish, daß fünf Minuten nach Induktion dieser Vorgänge 60% aller Ribosomen in der Zelle als inaktive Monosomen vorliegen, während sich im vegetativen Stadium 90% der Ribosomen in der Polysomenfraktion finden. Die in vegetativen Zellen mit den Polysomen assoziierten m-RNAs liegen in vivo unmittelbar nach Einsetzen des Entwicklungszyklus inaktiv in der Zelle, sind jedoch in vitro noch etwa vier Stunden lang translatierbar.

Lodish deutete diese Beobachtungen als eine Translationskontrolle, die darin besteht, daß intakte m-RNAs in vivo nicht mehr initiiert werden.

Dies erklärt jedoch nicht den drastischen Zerfall der Polysomen, also den Vorgang, der zu der von Lodish postulierten Translationskontrolle führt.

Um den Polysomenabbau zu erklären stellten wir folgende Arbeitshypothese auf:

Durch Entzug der Nährstoffe gerät der Organismus in einen Mangelzustand, der nach Marin (1976) in der Hauptsache in einem Aminosäuremangel besteht. Dadurch können die in der Zelle vorhandenen t-RNAs von ihren Synthetasen nicht mehr zu 100% mit ihren entsprechenden Aminosäuren beladen werden. Da die Proteinbiosynthese jedoch weiterläuft, muß zwangs-

läufig zu irgend einem Zeitpunkt eine nicht aminoacylierte t-RNA ans Ribosom binden. Da diese t-RNA keine Aminosäure trägt, kann die Polypeptidkette nicht weiter verlängert werden. Dies führt in allen bisher untersuchten eukaryontischen Systemen über einen unbekannten Mechanismus zu einer Polysomen-degradation. Nur Retikulozyten machen hier eine Ausnahme: unterbeladene t-RNAs stabilisieren die Polysomen. In Retikulozyten ist diese Art der Initiationskontrolle eventuell deshalb nicht verwirklicht, da sie nahezu ausschließlich Hämoglobin-m-RNA enthalten.

Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, sollte während des vegetativen Wachstums und sehr früh nach Induktion des Entwicklungszyklus der Beladungsgrad der t-RNAs in vivo gemessen werden.

Aus Überlegungen von Ogilvie (1979) war zu erwarten, daß eine einzige unterbeladene t-RNA Spezies genügt, um dieses Phänomen auszulösen und daß dieses Ereignis sehr bald nach Auftreten eines Aminosäuremangels einsetzen sollte. Ferner sollte nach diesen Überlegungen eine unterbeladene t-RNA nur kurzzeitig in vivo zu finden sein, denn durch die Unterbeladung kommt die Proteinbiosynthese fast zum Erliegen, während die Synthetase wegen der geringen Aminosäurekonzentration zwar langsam, jedoch stetig die t-RNA wieder belädt.

Hinzu kommt, daß während der Entwicklung proteolytische Prozesse in Gang kommen, die den intrazellulären Aminosäurepool wieder auffüllen.

Es galt daher, einerseits die Entwicklung durch Aminosäureentzug effektiv zu induzieren, andererseits sehr bald nach dieser Induktion den Beladungszustand der t-RNAs zu messen.

4.7.1. Bestimmung der Proteinbiosyntheserate
und des Polysomen/Monosomen Verhältnisses
nach Behandlung vegetativer Zellen mit
dem Histidinanalogon Histidinol

Um zu klären, ob eine unterbeladene t-RNA sowohl eine Reduktion der Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese, als auch einen Zerfall der Polysomen bewirkt, wurden vegetative Zellen mit dem Histidinanalogon Histidinol inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Einbau von radioaktiven Aminosäuren in neusynthetisiertes Protein untersucht und das Polysomen/Monosomen Verhältnis bestimmt.

Histidinol bewirkt eine Unterbeladung der t-RNA^{His}, da es zu der Aminosäure Histidin an der Aminoacyl-t-RNA-Synthetase als kompetitiver Inhibitor wirkt. (Hansen et al., 1972).

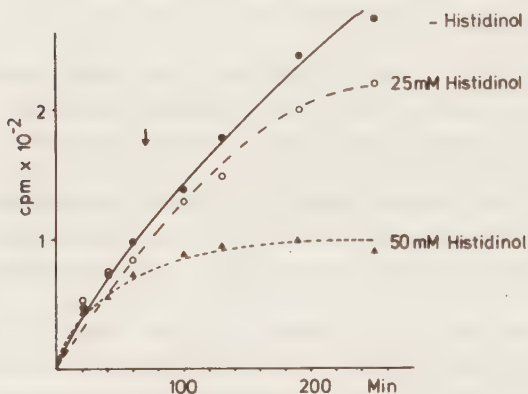
4.7.1.1. Einbau von ¹⁴C-Aminosäuren in neusynthetisiertes Protein

Drei Kulturen von je einem Milliliter mit einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml wurden unter Zusatz von je 0,5 µCi der ¹⁴C-markierten Aminosäuren Leucin, Threonin und Phenylalanin bei 22°C geschüttelt. Nach 70 Minuten wurde der Kultur (1) 50 µl Wasser, der Kultur (2) 50 µl einer 0,5 M Histidinollösung und der Kultur (3) 50 µl einer 1 M Histidinollösung zugesetzt.

50 µl Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, in TCA gefällt und die Radioaktivität in Toluolszintillator gezählt.

Abb. 30. zeigt die eingebaute Radioaktivität zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten. Während die Zellen im Kontrollansatz die Radioaktivität linear über 250 Minuten einbauten, war unter Histidinoleinwirkung die Einbaurrate je nach zugesetzter Konzentration deutlich gehemmt.

Abb. 30: Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in neusynthetisiertes Protein von Dictyostelium



Kulturen von Dictyostelium wurden unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen des Histidinanalogons Histidinol geschüttelt. Gleichzeitig wurde der Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in neusynthetisiertes Protein gemessen. Die Histidinolzugabe erfolgte 70 Minuten nach Inkubation der Zellen mit den radioaktiven Aminosäuren Leucin, Threonin und Phenylalanin. Der Einbau der Radioaktivität wurde über 250 Minuten verfolgt. Hierzu wurden 50 μl Proben in TCA gefällt und die Radioaktivität in Toluolszintillator gezählt.

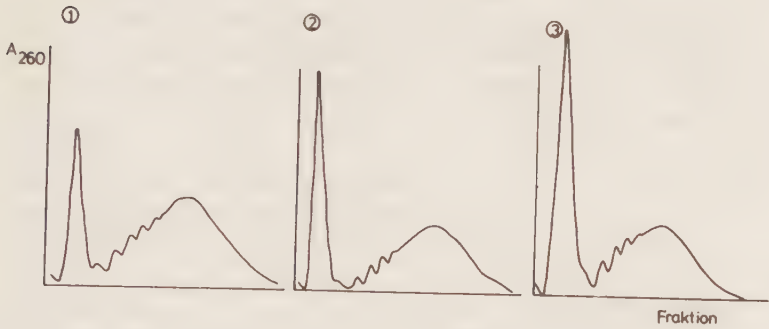
4.7.1.2. Präparation von Polysomen aus den mit Histidinol behandelten Zellen

Parallel zum vorher beschriebenen Versuch wurden aus drei Kulturen von je 10 ml mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml Polysomen präpariert.

Die Kultur (1) enthielt als Kontrolle kein Histidinol. In den Kulturen (2) und (3) waren jeweils 50 mM Histidinol enthalten.

Kultur (2) wurde nach 60-minütigem Einwirken, Kultur (3) nach 180 minütigem Einwirken von Histidinol aufgeschlossen.

Abb. 31: Polysomenprofile aus Zellen, die unter Zusatz von Histidinol gezüchtet wurden.



Polysomen wurden aus drei 10 ml Kulturen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml isoliert. Die Kultur (1) diente als Kontrolle. Den Kulturen (2) und (3) wurden je 50 mM Histidinol zugesetzt. Kultur (2) wurde nach 60 Minuten, Kultur (3) nach 180 Minuten aufgeschlossen. Die Trennung der Monosomen und der Polysomen erfolgte über einen linearen Saccharose-Gradienten (5-22% (w/v)) zwei Stunden bei $100\,000 \times g$ bei 3°C .

Tabelle 7: Verhältnis von Polysomen und Monosomen.

	Polysomen (%)	Monosomen (%)
Kontrolle	80,65	19,35
60 Minuten	70,04	29,96
180 Minuten	58,75	41,25

Die Versuche zeigen, daß eine unterbeladene t-RNA, hervorgerufen durch das Histidinanalogon Histidinol, sowohl die Rate der Proteinbiosynthese verlangsamt als auch parallel dazu das Verhältnis Polysomen/Monosomen zu Ungunsten der Polysomenfraktion verschiebt. Dies bestätigt die von uns angenommene Hypothese, daß der Polysomenzerfall in Dictyostelium durch eine t-RNA ausgelöst werden kann, die nicht beladen ist.

4.7.2. In vivo Beladungszustand von t-RNA zu verschiedenen Zeiten des Entwicklungszyklus von Dictyostelium Discoideum

Falls eine t-RNA in Dictyostelium in vivo unterbeladen ist, so tritt dieses, wie oben erläutert, nur kurzzeitig und zwar sehr bald nach Entzug der Nährstoffe (Aminosäuren) auf. Es wurde daher zu folgenden Zeiten unter den angegebenen Bedingungen der Beladungszustand der t-RNA gemessen (siehe hierzu 3.14.)

	Zeitpunkt der Ernte	Temperatur, bei der die Zellen zentrifugiert wurden	Waschen der Zellen mit Phosphatpuffer
1)	t_0	4°C	-
2)	$t_{45''}$	4°C	+
3)	$t_{90''}$	4°C	+
4)	$t_{180''}$	4°C	+
5)	$t_{45''}$	4°C	-
6)	$t_{180''}$	4°C	-
7)	$t_{25''}$	22°C	-
8)	$t_{35''}$	22°C	-
9)	$t_{60''}$	15°C	-
10)	$t_{120''}$	15°C	-
11)	$t_{600''}$	4°C	+

Tabelle 8.: Beladungsgrad spezifischer t-RNAs in vivo in Dictyostelium Discoideum während des vegetativen Wachstums und während der frühen Preaggregation.

t-RNA Präparation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aminosäure											
Ala	80,2				73,1	73,8					96,6
Asn	99,8	59,7	68,1	76,1	58,7	67,5	60,4	49,6	63,5	26,5	86,2
Asp	99,2				82,3	74,2	80,8	67,1	86,3	86,7	83,4
Arg	102,1	65,4			66,3	72,3	71,0	61,9	68,8	74,3	88,9
Cys	99,2										83,4
Gly	94,3	75,4	81,9		74,9	85,9	73,9	75,9	86,0	94,1	85,1
Glu	80,6				75,5						95,4
Ile	91,5	78,2	77,4		85,1	85,8	99,0	78,4	83,1	97,9	
Leu	101,7	70,0	82,2	90,1	95,7	93,1	101,4	103,9	107,4	82,1	90,7
Met	113,4	109,7	89,6		75,1	78,3	90,0	82,8	86,4	97,9	
Phe	98,5	96,3	73,0		84,0	82,2	86,9	78,4	89,6	80,2	89,9
Pro	113,2				78,0	67,2					88,3
Ser	105,4										100,3
Tyr	86,0						76,8	75,4	88,4	91,1	97,1
Val	83,1	82,9	65,3		85,7	80,7	88,4	79,9	94,2	87,8	95,7

Die Zellen müssen in der Weise aufgeschlossen werden, daß alle biochemischen Funktionen gleichzeitig gestoppt werden. Die Schwierigkeiten sind bei Ogilvie et al.

(1979) eingehend beschrieben. Ferner müssen die t-RNAs unter Bedingungen präpariert werden, die den aktuellen Beladungszustand in der Zelle konservieren.

Nach Präparation der t-RNAs wurden die Proben geteilt. Die eine Hälfte eines jeden Aufschlusses wurde mit N-metaperjodat behandelt, während die andere Hälfte als Kontrolle mitgeführt wurde.

Der in vivo Beladungszustand errechnet sich als Prozentsatz der Beladbarkeit der mit Perjodat behandelten t-RNA im Verhältnis zur Kontrolle ("Mock"-behandelte t-RNA).

Tabelle 8. zeigt den Prozentsatz der in vivo Beladung der t-RNAs mit den angegebenen Aminosäuren. Die t-RNAs waren nur schlecht beladbar mit den Aminosäuren Glutaminsäure, Histidin und Threonin, so daß für diese Aminosäuren keine eindeutigen Aussagen gemacht werden konnten.

Nicht getestet wurde mit den Aminosäuren Lysin und Tryptophan.

Die Daten zeigen folgendes Ergebnis:

- 1.) Im vegetativen Stadium (1) und nach 10 Minuten Schütteln in Phosphatpuffer (11) sind alle getesteten t-RNAs in vivo voll beladen.
- 2.) Im dazwischen liegenden Zeitraum ist die Asparagin-akzeptierende t-RNA in jeder getesteten Präparation zu einem gewissen Prozentsatz unterbeladen.
- 3.) Alle anderen t-RNAs, eventuell mit Ausnahme der Arginin-akzeptierenden t-RNA, zeigten nahezu den gleichen Beladungsgrad wie die vegetativen t-RNAs, d.h., sie sind zu jedem Testzeitpunkt in vivo voll beladen.
- 4.) Der Unterbeladungsgrad der t-RNA^{Arg} erreicht

in keinem Fall die Werte der t-RNA^{Asn} für die entsprechende Präparation.

- 5.) Der niedrigste Beladungsgrad für die t-RNA^{Asn} wurde in der Präparation (10) gefunden, also nach zweiminütigem Hungern, wobei die Zellen bei 15°C abzentrifugiert wurden.
- 6.) Die Präparation (8), bei der die Zellen bei 22°C abzentrifugiert und 35 Sekunden in Phosphatpuffer geschüttelt wurden, enthält etwa 50% unterbeladene t-RNA^{Asn}.

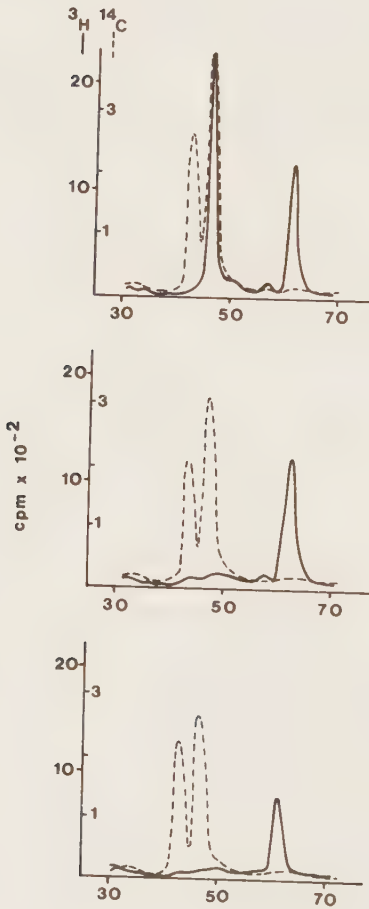
Diese Experimente bestätigten die Hypothese, nach der kurzzeitig nach Entzug des Mediums eine t-RNA in Dictyostelium unterbeladen sein muß und es danach zur Polysomendegradation kommt.

4.7.3. Beladungszustand der Isoakzeptoren t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃ in vivo

Als nächstes wurde die Frage gestellt, ob sich die Unterbeladung der t-RNA^{Asn} gleichmäßig auf die beiden in Dictyostelium vorkommenden Hauptisoakzeptoren t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃ verteilt oder ob ein Isoakzeptor in größerem Maße betroffen ist als der andere. Getestet wurden die Präparationen (1), (8) und (10). Die mit Na-metaperjodat behandelten t-RNAs wurden hierzu mit ³H-Asperagin, die "Mock"-behandelten t-RNAs mit ¹⁴C-Asparagin aminoacyliert.

Anschließend wurden beide Ansätze gemeinsam über eine RPC-5 Säule getrennt. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Isoakzeptoren t-RNA^{Asn}₃ an der gleichen Stelle im RPC-5 Profil eluiert werden, während der ¹⁴C-markierte Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₂ nicht identisch läuft mit dem ³H-markierten Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₂. Die t-RNA^{Asn}₂ enthält, wie in (4.5.3.) gezeigt die Hypermotifikation Q. Da diese durch Perjodat modifiziert

Abb. 32.: Beladung der Asparagin-spezifischen Iso-
akzeptoren in vivo während des Wachstums
und während der frühen Preaggregation.



wird, wird der ^3H -markierte Isoakzeptor $\text{t-RNA}_2^{\text{Asn}}$ später eluiert, als der ^{14}C -markierte, der als Kontrolle nicht mit Periodat behandelt wurde.

Das Ergebnis zeigt Abb. 32.

Im vegetativen Stadium, in dem die in vivo-Beladung 100% beträgt, sind beide Isoakzeptoren voll beladen. Tritt jedoch nach Entzug der Nährstoffe kurzzeitig eine Unterbeladung der $\text{t-RNA}_2^{\text{Asn}}$ auf, so zeigt sich, daß dann der Isoakzeptor $\text{t-RNA}_2^{\text{Asn}}$ gar nicht beladen ist, während sich die Restbeladung ganz in der $\text{t-RNA}_3^{\text{Asn}}$ findet.

Für die Beladung der beiden Isoakzeptoren während des vegetativen Wachstums und während der frühen Entwicklung ergeben sich folgende quantitativen Daten:

Tabelle 9: Beladungsgrad der $\text{t-RNA}_2^{\text{Asn}}$ und der $\text{t-RNA}_3^{\text{Asn}}$ während des Wachstums und der frühen Entwicklung.

	Vegetatives Wachstum	Präaggregation		
		35 Sek.	2 Min.	10 Min.
$\text{t-RNA}_2^{\text{Asn}}$	100%	82%	50%	100%
$\text{t-RNA}_3^{\text{Asn}}$	100%	0%	0%	100%

Legende zu Abb. 32:

Die t-RNAs der Präparationen (1), (8) und (10) wurden mit radioaktiv markiertem Asparagin aminoacyliert, wobei die Kontrollen mit ^{14}C -Asparagin, die mit Na-metaperjodat behandelten t-RNAs mit ^3H -Asparagin beladen wurden. Die beiden Ansätze einer jeden Präparation wurden vereinigt und die t-RNA-Isoakzeptoren über RPC-5 Säulen getrennt. a): vegetatives Wachstum

b): Präaggregation (35 Sekunden)

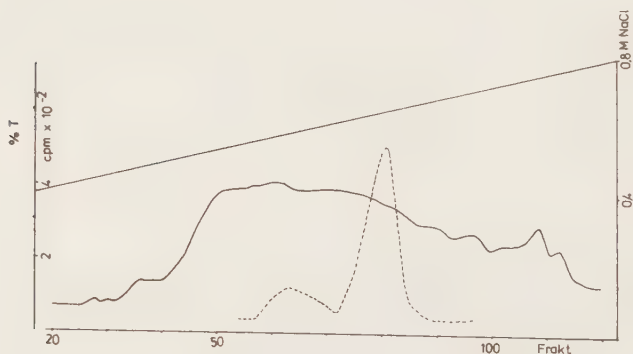
c): Präaggregation (120 Sekunden)

4.8. Michaelis-Menten-Kinetik der Asparaginsynthetase:
Einfluß der Isoakzeptoren $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ und $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ auf den K_m der Aminosäure Asparagin

Eine Erklärung für die unterschiedliche Beladung der $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ Isoakzeptoren in der sehr frühen Präaggregationsphase könnte sein, daß der K_m für Asparagin im Bezug auf den $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ Enzymkomplex bzw. $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ Enzymkomplex verschieden ist. Dies würde bedeuten, daß bei niedriger Asparagin Konzentration das Enzym die $t\text{-RNA}$ -Isoakzeptoren unterschiedlich schnell belädt.

Um dies zu testen wurden 1300 A_{260} Gesamt- $t\text{-RNA}$ aus vegetativen Zellen über eine RPC-5 Säule bei pH 4,5 getrennt. Im Eluat wurde auf Asparagin-Akzeptor-Aktivität getestet.

Abb. 33: RPC-5 Chromatographie von Gesamt- $t\text{-RNA}$ aus Dictyostelium Discoideum



1300 A_{260} Gesamt- $t\text{-RNA}$ aus Dictyostelium wurden über eine RPC-5 Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,4-0,8 M) getrennt (siehe 3.11.). Das Eluat wurde auf Asparagin-Akzeptor-Aktivität getestet. ---- Akzeptor-Aktivität, — % Transmission bei 254 nm.

Die Fraktionen 26-68 wurden vereinigt, mit Äthanol gefällt und als t-RNA^{Asn}₂-Fraktion bezeichnet.

Die vereinigten Fraktionen 73-120 enthielten die t-RNA^{Asn}₃.
Ein 250 µl Testansatz enthielt:

100 mM	Na-Cacodylat pH 7,5
5 mM	ATP (neutralisiert mit NaOH)
10 mM	MgCl ₂
2,5mM	Spermidin
50 µg	Protein eines t-RNA-freien S 100 Überstandes aus D. Discoideum (siehe 3.6.1.)
6 A ₂₆₀	t-RNA ^{Asn} ₂ -Fraktion
bzw. 3 A ₂₆₀	t-RNA ^{Asn} ₃ -Fraktion

Die Aminosäure Asparagin wurde ¹⁴C-markiert in den Konzentrationen 20 µM, 10 µM, 4 µM, 2 µM, 1,5 µM, 1 µM und 0,5 µM eingesetzt.

Aus den Michaelis-Menten-Kinetiken ergaben sich folgende K_m-Werte für Asparagin (siehe Abb. 34 a und b.)

t-RNA^{Asn}₂-Enzymkomplex : 1,28 µM

t-RNA^{Asn}₃-Enzymkomplex : 4,65 µM

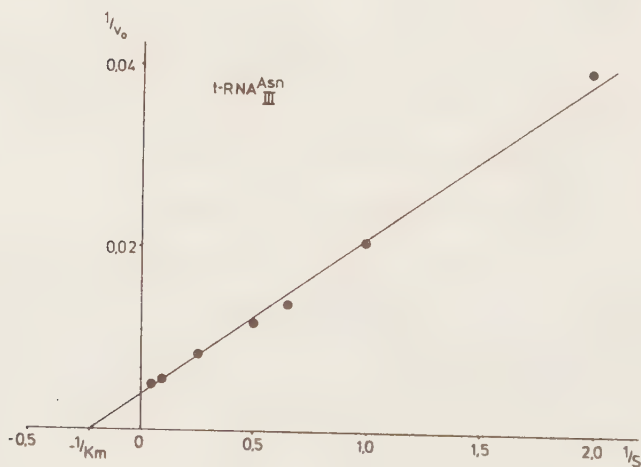
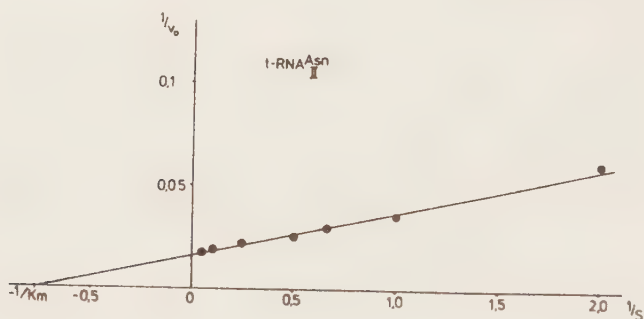
Dies könnte erklären, daß die t-RNA^{Asn}₂ in vivo in einem Stadium, wo sehr wenig Asparagin in der Zelle vorhanden ist, bevorzugt beladen wird gegenüber der t-RNA^{Asn}₃.

Über die v_{max} Werte kann aus diesen Versuchen keine Aussage gemacht werden, da nicht sicher war, daß das Enzym mit t-RNA gesättigt war.

Mehr t-RNA in den Ansatz zu geben, um Sättigung am Enzym zu erhalten ist bedenklich, da so große Mengen von t-RNA die Grenze der Pufferkapazität des Beladungsansatzes erreichen.

Um genau die v_{max} Werte zu bestimmen, müßte mit stärker angereinigten t-RNA-Isoakzeptoren gearbeitet werden.

Abb. 34: Einfluß der Isoakzeptoren $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_2$ und $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_3$ auf den K_m der Aminosäure Asparagin.



Lineweaver-Burk-Plot der Aminoazylierungskinetik von $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_2$ und $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_3$ aus Dictyostelium mit einem Enzymextrakt (S-100) aus Dictyostelium bei variierenden Asparagin-Konzentrationen.

Vergleich der Struktur von t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃

Der Strukturvergleich der beiden Hauptisoakzeptoren für die Aminosäure Asparagin sollte folgende Fragen beantworten:

- 1.) Unterscheiden sich die beiden t-RNA-Isoakzeptoren in ihrer Primärstruktur?
- 2.) Unterscheiden sie sich nur in ihrem Modifikationsmuster, eventuell nur in der Hypermodifikation??

Diese Fragen sollten wie folgt untersucht werden:

- a) Isolierung der spezifischen Isoakzeptoren t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃.
- b) In vitro Phosphorylierung der t-RNAs mit ³²P-ATP und Polynukleotidkinase.
- c) Analyse der 5'-³²P-Nukleotide der beiden Isoakzeptoren
- d) Fingerprintanalyse der beiden 5'-³²P-t-RNAs

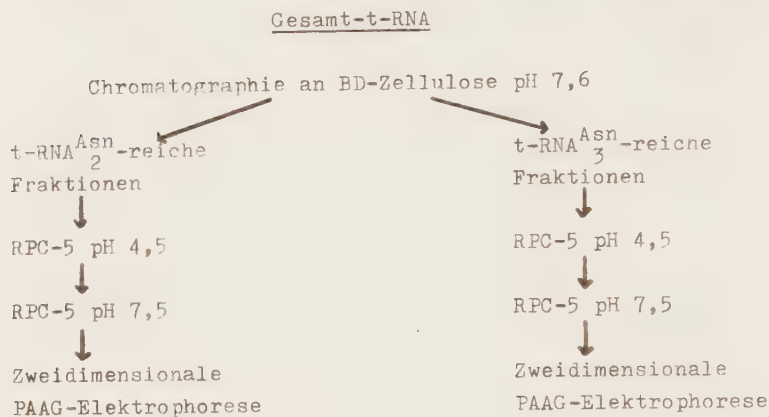
4.9.1. Isolierung von t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃

Die t-RNAs wurden aus Zellen des Preaggregationsstadiums isoliert, da hier der Anteil an t-RNA^{Asn}₂ erheblich größer ist als in Zellen des vegetativen Stadiums (Palatnik et al., 1977).

Die Zellkulturen hatten im Durchschnitt eine Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml und wurden 16 Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt.

Aus insgesamt 76 Liter Medium wurden 120 Gramm Zellen geerntet und daraus 2500 A₂₆₀ Gesamt-t-RNA isoliert (siehe 3.3.2.).

Tabelle 10: Schema der Isolierung der spezifischen $t\text{-RNA}_2^{\text{Asn}}$ und $t\text{-RNA}_3^{\text{Asn}}$ aus Dictyostelium.



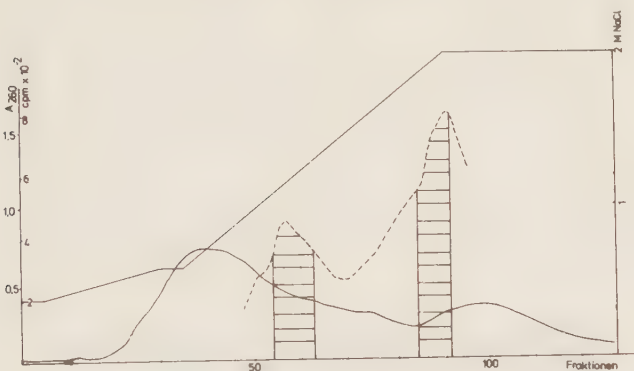
Die t-RNA Ausbeute nach der RPC-5 Chromatographie bei pH 7,5 und ihre Akzeptoraktivitäten sind in Tabelle 11. dargestellt.

Tabelle 11: t-RNA-Ausbeute und Akzeptoraktivität nach der RPC-5 Chromatographie bei pH 7,5.

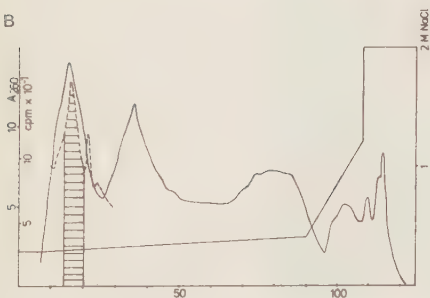
	A_{260}	<u>Akzeptoraktivität</u> $A_{260} \text{ t-RNA}$
$t\text{-RNA}_2^{\text{Asn}}$	0,8	280 pmol Asn
$t\text{-RNA}_3^{\text{Asn}}$	0,6	550 pmol Asn

Abb. 35: Chromatographische Reinigung von t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃ aus Dictyostelium.

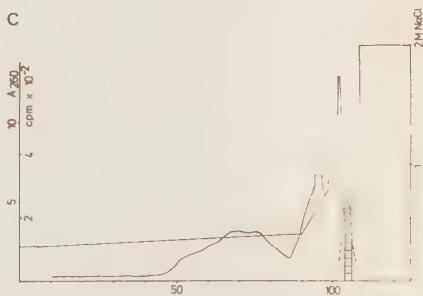
A



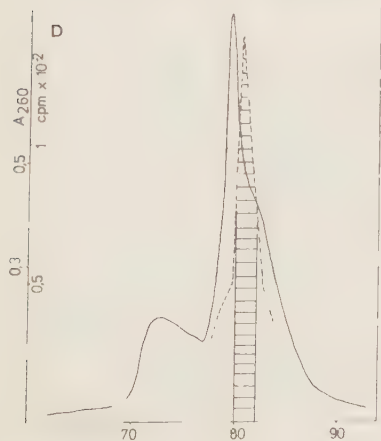
B



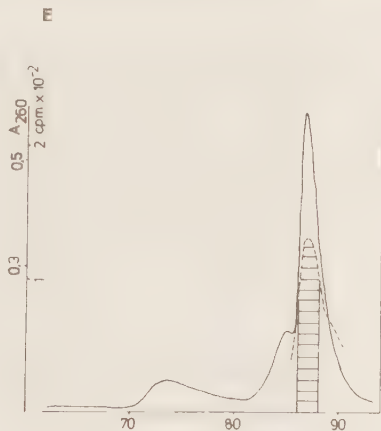
C



D



E



Legenden zu Abb. 35:

- A. Etwa 2500 A₂₆₀ Gesamt-t-RNA wurden auf eine BD-Zellulosesäule (1,1 x 56 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit steigenden NaCl-Konzentrationen in einem Puffer von 0,01 M Tris/HCl pH 7,6; 0,01 M MgCl₂; 0,001 M Na₂S₂O₃. Folgender NaCl-Gradient wurde mit dem JKF Gradient Mixer 11300 Ultra grad geformt: 1 Std. 0,4 M NaCl; 5 Std. 0,4 M → 0,6 M NaCl; 1 Std. 0,6 M NaCl; 11 Std. 0,6 M → 2 M NaCl; 6 Std. 2 M NaCl. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml/Stunde.
- B. Die gesammelten und gefällten Fraktionen, die die t-RNA^{Asn}₂ enthielten, wurden auf eine RPC-5-Säule (HPLC) aufgetragen und mit 160 bar bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 2 ml/min getrennt. Der Grundpuffer enthielt 0,01 M Na-acetat; 0,01 M Mg-acetat pH 4,5. Die t-RNAs wurden mit folgendem Gradienten eluiert: 6 Min. 0,4 M NaCl; 84 Min. 0,4 M → 0,8 M NaCl; 18 Min. 0,6 M → 2 M NaCl; 12 Min. 2 M NaCl.
- C. Die gesammelten und gefällten Fraktionen der BD-Zellulose Chromatographie, die die t-RNA^{Asn}₃ enthielten, wurden wie in Absatz B. beschrieben weiterfraktioniert.
- D. 5 A₂₆₀ angereicherte t-RNA^{Asn}₂ wurden über eine RPC-5 Säule getrennt, die mit 0,01 M Mg-acetat; 0,01 M Tris/HCl pH 7,5; 0,001 M β-ME und 0,3 M NaCl äquilibriert war. Eluiert wurde die t-RNA mit 160 bar bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 2 ml/min mit folgendem Gradienten: 90 Min. 0,3 M → 0,8 M NaCl; 10 Min. 0,8 M → 2 M NaCl; 20 Min. 2 M NaCl.

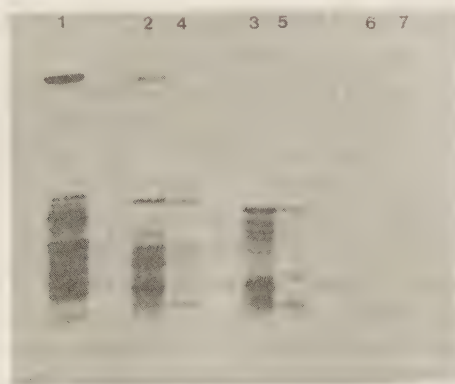
Die Analysen B. - E. wurden in einer Säule der Dimension von 25 x 0,4 cm unter HPLC- Bedingungen durchgeführt.

E. 2,8 Λ_{260} angereicherte $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_3$ wurden in gleicher Weise weiter aufgereinigt, wie in Absatz D. beschrieben.

———— Absorption bei 254 nm

----- Akzeptoraktivität

Abb. 36: Elektrophorese von Gesamt-t-RNA und der angereicherten $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}$ -Fraktionen aus Dictyostelium.



Die Reinheit der $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}$ wurde nach jedem Anreicherungsschritt an einem 10%igen Polyacrylamidgel bestimmt (siehe 3.12.).

1.: Gesamt-t-RNA

2.: $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_2$ nach BD-Zellulose-Chromatographie

3.: $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_3$ nach BD-Zellulose-Chromatographie

4.: $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_2$ nach RPC-5 pH 4,5

5.: $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_3$ nach RPC-5 pH 4,5

6.: $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_2$ nach RPC-5 pH 7,5

7.: $t\text{-RNA}^{\text{Asn}}_3$ nach RPC-5 pH 7,5

Nach der Elektrophorese wurden die t-RNAs ohne zu Färben im Gel ermittelt und anschließend elektrophoretisch eluiert (siehe 3.13.3.). Da sie jeweils in einer Hauptbande erschienen, wurde nach der Elektrophorese nicht mehr auf Akzeptoraktivität geprüft.

Die Ausbeuten waren für t-RNA^{Asn}₂ 0,3 A₂₆₀ und für die t-RNA^{Asn}₃ 0,5 A₂₆₀ (Ausgangsmaterial: 2500 A₂₆₀)

4.9.2. In vitro-Markierung der t-RNAs mit ³²P

Je nachdem, ob das Nukleotidmuster der t-RNAs oder das Oligonukleotidmuster bestimmt werden sollte, wurden die t-RNA-Fragmente nach der Vorschrift von Grupa und Randerath (1979) oder von Silberklang et al. (1979) mit ³²P markiert (siehe 3.15.).

Überschüssiges ATP wurde im ersten Fall durch Apyrase zerstört. Unter den hier angewendeten Bedingungen und Konzentrationen hydrolysiert das Enzym nur die endständige Phosphatanhydridbindung des ATP's und besitzt keine anderen Phosphatase- oder Nuklease-Aktivitäten.

Im zweiten Fall wird dem Ansatz Glukose und Hexokinase zugesetzt, wodurch überschüssiges ATP mit der Glukose Glukose-6-Phosphat bildet. Diese Reaktion verlief jedoch nicht quantitativ, sodaß noch überschüssiges γ -³²P-ATP im Ansatz vorhanden war. Dies erschwerte beträchtlich die Auswertung der Elektrophorese. Daher wurde in späteren Experimenten ATP im Unterschuß bezogen auf t-RNA-Fragmente zugegeben.

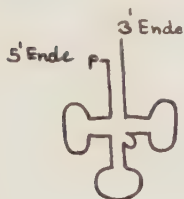
4.9.3. Nukleotidanalyse der beiden t-RNAs

Da die Polyonukleotidkinase aus T₄ Phagen-infiziertem E. coli nur an Oligonukleotiden, nicht jedoch an Mononukleotiden arbeitet, wurden die t-RNAs so zu Oligonukleotiden gespalten, daß statistisch die t-RNA unspezifisch nach jeder Base hydrolysiert wird. Hierbei sollte jedes t-RNA Molekül möglichst nur eine Schnittstelle

erhalten (Grupa und Randerath, 1979).

Hierzu wurden 2 μg t-RNA 6 Minuten in bidestilliertem Wasser auf 80°C erhitzt.

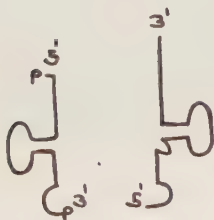
Dabei entstehen folgende Fragmente:



intakte t-RNA mit einem
Phosphatrest am 5'-Ende



6 Minuten Hydrolyse bei 80°C
in bidestilliertem Wasser



5'-Fragment mit einem Phosphat-
rest am 5'-Ende

3'-Fragment mit einer freien
5'-OH-Gruppe am 5'-Ende

5'-Fragment 3'-Fragment

An das 5'-Ende des 3'-Fragments kann nun mit Polynukleotidkinase und γ - ^{32}P -ATP ein radioaktiver Phosphatrest ansynthetisiert werden.

Die so markierten Fragmente werden mit Ribonuklease P_1 verdaut, wobei ^{32}P -markierte 5'-Nukleotide erhalten werden.

Da die Spaltung der t-RNA unter den oben beschriebenen Bedingungen statistisch nach jeder Base erfolgt, sind alle Nukleotide markiert mit Ausnahme des Nukleotids

am 5'-Endes der t-RNA.

Die Nukleotide werden dünnschichtchromatographisch getrennt und anschließend durch Autoradiographie ermittelt. Folgende Nukleotide sind in den beiden Asparagin spezifischen Isoakzeptoren enthalten:

t-RNA ^{Asn} ₂	t-RNA ^{Asn} ₃
A	A
C	C
G	G
U	U
m ¹ A	m ¹ A
m ⁵ C	m ⁵ C
D	D
m ¹ G	m ¹ G
m ² G	m ² G
m ² G	m ² G
Gm	Gm
Q	-
T	T
-	t ⁶ A

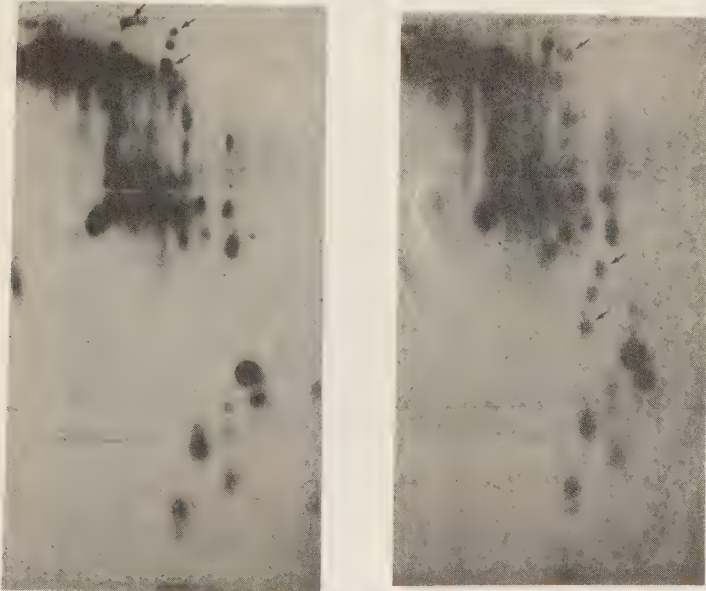
Die Modifikation Pseudouridin konnte in den t-RNAs nicht nachgewiesen werden. Dies kann dadurch bedingt sein, daß die Polynukleotidkinase ein Pseudouridin am 5'-Ende nicht oder nur geringfügig modifiziert.

Ferner ist in der t-RNA^{Asn}₂ eine Modifikation enthalten, die nicht identifiziert werden konnte (siehe Pfeil in Abb. 37.).

Deutliche Intensitätsunterschiede lassen die Modifikationen Gm und m⁷G erkennen.

Abb. 37. zeigt die Autoradiographien der Nukleotidmuster von t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃.

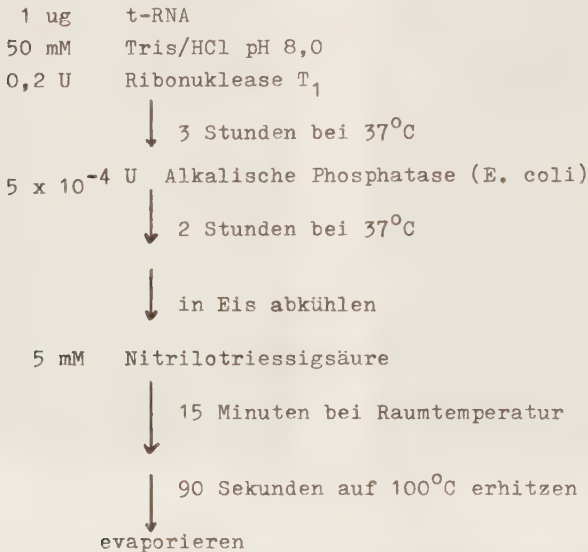
Abb. 47: Nukleotidmuster von $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Acn}}$ und $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$.



Die spezifischen t-RNA Isoakzeptoren (2 μg) wurden 6 Minuten bei 80°C in bidestilliertem Wasser inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente am 5'-Ende mit ^{32}P markiert, mit Ribonuklease P_1 zu 5'-Nukleotiden verdaut und letztere zweidimensional-dünnschichtchromatographisch getrennt (1.Dim. Fließmittel G; 2.Dim. Fließmittel H.). Der Pfeil deutet auf eine Modifikation, die nicht identifiziert werden konnte.

4.9.4. Fingerprintanalyse von t-RNA^{Asn}₂ und
 t-RNA^{Asn}₃

Die spezifischen t-RNAs wurden in folgenden 10 ul Ansätzen mit Ribonuklease T₁ inkubiert

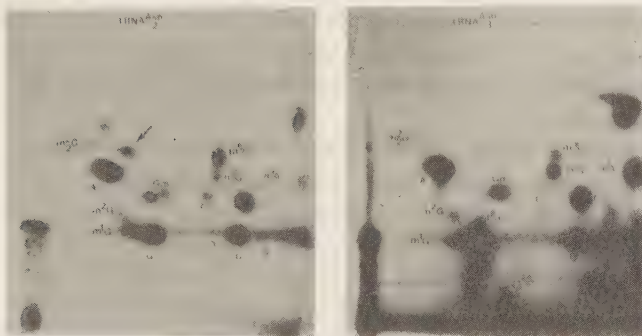


Die Oligonukleotide wurden am 5'-Ende mit Polynukleotidkinase und -³²P-ATP markiert und nach Barell und Sanger (1967) elektrophoretisch getrennt.

Die Autoradiographien der Fingerprints von t-RNA^{Asn}₂ und t-RNA^{Asn}₃ aus Dictyostelium sind in Abb. 38. dargestellt. Sie zeigen sehr große Homologien, sind jedoch nicht völlig gleich. Die Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Diese können dadurch zustande kommen, daß die t-RNAs geringfügige Unterschiede in der Primärstruktur enthalten. Eine andere Möglichkeit könnte sein, daß sie in der Primärstruktur identisch sind und sich nur in

Abb. 38: Oligonukleotidspaltungsmuster von $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ und $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ nach Ribonuklease T_1 -Verdauung.



Je 1 μg spezifische $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ und $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ wurden mit Ribonuklease T_1 inkubiert und anschließend mit alkalischer Phosphatase aus *E. coli* behandelt. Danach wurden die Oligonukleotide mit Polynukleotidkinase und $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ an ihren 5'-Enden markiert und zweidimensional hochspannungselektrophoretisch getrennt. (1. Dimension: Zelluloseacetatfolie, 4 Stunden mit 2700 Volt in 0,5% Pyridin, 5% Eisessig pH 3,5, 7 M Harnstoff; 2. Dimension: DEAE-Papier, 20 Stunden mit 850 Volt in 7% Ameisensäure). Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme drei Stunden auf Agfa-Filmen exponiert. Die Pfeile deuten auf die Unterschiede in den beiden Analysen.

ihren Modifikationen unterscheiden. Diese Unterschiede sollten in den Modifikationen des Guanins bestehen, da die Ribonuklease T_1 spezifisch die t-RNA nach jedem Guanin spaltet.

Die Nukleotidanalyse der beiden t-RNAs zeigt, daß t-RNA^{Asn}₂ die Modifikation Q enthält und daß in der t-RNA^{Asn}₃ größere Mengen von Gm vorhanden sind.

Q wird von der Ribonuklease partiell erkannt während das Enzym die t-RNA nach einem ribosemethylierten G nicht spaltet.

Die genauen Unterschiede in der Struktur der t-RNAs können letztlich nur nach Aufklärung der kompletten Primärsequenz ermittelt werden.

5.

Diskussion

Der Schleimpilz *Dictyostelium Discoideum* (Stamm AX2) wächst vegetativ als einzellige Amöbe in einem komplexen Medium. Durch Nahrungsentzug tritt der Organismus in einen Entwicklungszyklus ein und bildet zwei verschiedene Zelltypen aus: Stielzellen und Sporenzellen.

Dieses System diente in dieser Arbeit zum Studium der Funktion von t-RNA und t-RNA-Modifikationen.

Es wurde Gesamt-t-RNA aus drei Entwicklungsstadien, dem vegetativen Wachstum, dem Preaggregationsstadium und aus Sporen isoliert und die Basenzusammensetzung untersucht. Die t-RNAs werden zu Nukleosiden nach der Methode von Randerath (1972) nachträglich mit Tritium markiert. Durch diese Methode werden die häufigsten Modifikationen der t-RNA erfaßt. Die Gesamtkomposition der gefundenen modifizierten Basen war vergleichbar mit anderen eukaryontischen Organismen, die auf diese Art analysiert wurden (Chia et al., 1976).

Qualitativ wurden keine Unterschiede in den Modifikationen der t-RNAs aus den drei untersuchten Entwicklungsstadien gefunden.

In Sporen-t-RNA war im Vergleich zur vegetativen t-RNA etwas weniger m^5C und Pseudouridin enthalten. Deutliche Unterschiede wurden für die Modifikation Ribothymidin beobachtet. Während die t-RNAs vegetativer Zellen 0,9 mol% Ribothymidin enthielten, nahm die Menge an Ribothymidin im Laufe der Entwicklung stark ab. Die t-RNA aus dem Preaggregationsstadium enthielt 0,5 mol%, die t-RNA aus Sporen nur noch 0,4 mol% rT (Dingermann et al., 1977).

Bei der Präparation wurden Cytoplasma und Mitochondrien nicht getrennt, so daß in der isolierten t-RNA geringere Mengen mitochondrialer t-RNA vorhanden sein können.

Von mitochondrialer t-RNA ist bekannt, daß sie in marinen Organismen nur 0,2 mol% rT enthält (Chia et al., 1976). Der Abfall der Ribothymidin-Konzentration in *D. Discoideum* während der Entwicklung kann jedoch nicht durch eine Zunahme von mitochondrialer t-RNA erklärt werden, da die Anzahl der Mitochondrien eher ab- als zunimmt (Loomis, 1975).

Auch während der Entwicklung der niederen Pflanze *Acetabularia mediterranea* nimmt der Ribothymidin-Gehalt in den t-RNAs ab (Schmidt, Kersten, Schweiger, 1977). In beiden Organismen ist der rT-Gehalt am höchsten im vegetativen Stadium, in dem nahezu alle Proteine mit einer sehr hohen Rate synthetisiert werden.

Mehrere Möglichkeiten könnten den geringeren Gehalt an rT in den Sporen erklären:

- 1.) Während der Entwicklung neusynthetisierte t-RNA könnte an der Position 54 in geringerem Maße zu Ribothymidin modifiziert werden; die rT-haltige t-RNA des vegetativen Stadiums könnte im Verlauf des Lebenszyklus abgebaut werden.
- 2.) Ribothymidin an der Position 54 könnte zu 2'-O-methyl-Ribothymidin weiter modifiziert werden. Dieses Nukleosid läßt sich mit der Methode nach Randerath nicht nachweisen.

Durch heterologe Methylierung der t-RNAs aus verschiedenen Stadien mit dem rT-bildenden Enzym aus *E. coli* konnte gezeigt werden, daß im Preaggregationsstadium unter anderem eine *asparagin-spezifische* t-RNA U 54 auftritt, die in t-RNAs des vegetativen Stadiums nicht nachzuweisen war (Dingermann et al., 1979a).

Durch in vivo-Markierung der t-RNAs mit Methionin und anschließende Produktanalyse der methylierten Basen konnte M. Mach in unserem Arbeitskreis zeigen, daß in *D. Discoideum* während der Postaggregation größere Mengen

von 2'-O-methyl-Ribothymidin synthetisiert werden. Die Hypermodifikation 2'-O-methyl-Ribothymidin wurde bisher nur in t-RNA aus Kaninchenleber gefunden (Gross et al., 1974).

Fillinger und Borek (1969) haben gezeigt, daß D. Discoideum-Extrakte aus sich entwickelnden Zellen untermethylierte t-RNA aus E. coli zu einem geringeren Ausmaß methylieren als Extrakte aus vegetativen Zellen. Die geringere Methylierungskapazität, die wahrscheinlich durch Inhibitoren von t-RNA Methyltransferasen verursacht wird (Sherma und Borek, 1970), könnte die Akkumulation von Methylgruppen-defizienter t-RNA während der Entwicklung des Schleimpilzes erklären.

Alle prokaryontischen- und eine große Zahl eukaryontischer t-RNAs, die sequenziert wurden, haben an der Position 54 das modifizierte Nukleosid Ribothymidin in der stark konservierten Sequenz GT~~U~~CPu. Die Methylierung von U 54 zu rT 54 scheint eine bedeutende Rolle zu spielen in der Evolution, da rT nur einmal in einem t-RNA Molekül vorkommt und immer die gleiche Position einnimmt. Zusätzlich sind zwei biochemische Synthesewege für dieses Nukleosid bekannt: Der gewöhnliche SAM-abhängige Syntheseweg in gram-positiven Bakterien und in Eukaryonten (Mandel und Borek, 1963) und die Tertrahydrofolat-abhängige Synthese in den meisten gram-negativen Mikroorganismen (Schmidt, Arnold, Kersten, 1976).

Björk und Neidhardt (1975) haben gezeigt, daß ein E. coli Stamm mit rT 54 in der t-RNA gegenüber einer rT-defizienten Mutante, die in der t-RNA ein U 54 enthält, im Vorteil ist. In einer Mischkultur überwächst der Elternstamm die Mutante.

Eukaryontische t-RNAs, die an der P o s i t i o n 54 ein U r i d i n enthalten, haben wir nachgewiesen durch Methylierung dieses Uridinrestes mit dem rT-syn-

thetisierenden Enzym aus *E. coli* und ^3H -markiertem SAM zu ^3H -markiertem Ribothymidin. Danach wurde die Gesamt-t-RNA an Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die radioaktiv-markierten Spezies durch Fluorographie ermittelt. Durch die zweidimensionale Polyacrylamidgel Elektrophorese wurde die Gesamt-t-RNA aus *Dictyostelium* in etwa 40 spezifische Spezies aufgetrennt. Etwa 19 dieser t-RNAs ließen sich durch heterologe Methylierung markieren, d.h. sie besitzen Uridin an der Position 54.

Im Preaggregationstadium wurde eine methylierbare t-RNA^{Asn} ermittelt. Diese t-RNA^{Asn} enthält U 54 anstelle von rT und war in t-RNA aus vegetativen Zellen nicht nachzuweisen.

Diese t-RNA^{Asn} könnte identisch sein mit der von Palatnik et al., (1977) beschriebenen t-RNA^{Asn}₂.

Die Analyse des T ψ CG-Fragments nach Spaltung der Preaggregations-t-RNA^{Asn} mit Ribonuklease T₁ ergab die Zusammensetzung G; T; ψ ; C und U. Das ist ein Hinweis dafür, daß diese t-RNA zu einer Klasse von Transferribonukleinsäuren gehört, die an der Position 54 variable Mengen von Uridin respektive Ribothymidin enthalten. Solche t-RNAs wurden zuerst von Keith et al., (1978) in Eukaryonten gefunden.

In in vitro Versuchen haben Roe und Tsen (1977) mit dieser Klasse t-RNAs gezeigt, daß die Geschwindigkeit der Poly-Phenylalanin-Synthese in einem Poly-Uridin abhängigen System streng mit dem prozentualen Gehalt an Ribothymidin von t-RNA^{Phe} korreliert.

Diese Klasse von t-RNAs, so wurde von Roe vermutet, könnte die Proteinbiosyntheserate in Eukaryonten auf der Translationsebene modulieren.

Die Bedeutung der T ψ CG- bzw. der U ψ CG-Sequenz in der t-RNA in Bezug auf die Bindung der t-RNAs in die ribosomale A-Seite wird zur Zeit intensiv diskutiert. Grundlage dieser Diskussion sind folgende Beobachtungen:

- 1.) Die 5S r-RNA in Prokaryonten enthält eine komplementäre Sequenz GAAC (Ofengand und Henes, 1969 und Erdmann, 1977).
In der 5,8S r-RNA der Eukaryonten ist diese Sequenz mehrfach enthalten.
- 2.) Ein T ψ CG-Fragment verhindert die EF-Tu abhängige Bindung einer beladenen t-RNA in die ribosomale A-Seite (Erdmann et al., 1973).
- 3.) Nach Bindung des Fragments T ψ CG in die ribosomale A-Seite wird in Prokaryonten die Synthese des Faktors der strengen Kontrolle (pppGpp bzw. ppGpp) induziert. Diese Synthese wird physiologisch durch die Bindung einer unterbeladenen t-RNA in die ribosomale A-Seite des Ribosoms ausgelöst (Richter et al., 1973).
- 4.) Durch Codon/Anticodon-Interaktion wird die Konformation der t-RNA dahin gehend verändert, daß die T ψ CG-Sequenz von außen zugänglich wird (Schwarz et al., 1974 und Schwarz et al., 1976).
- 5.) In einem Faktorabhängigen E. coli System wird unterschiedlich schnell Poly-A-abhängig Poly-Lysin synthetisiert je nachdem ob die spezifische t-RNA^{Lys} an der Position 54 ein Uridin oder ein Ribothymidin enthält (Albani, 1979).
- 6.) Faktorunabhängig binden spezifische Lysin-t-RNAs rT 54 aus E. coli und B. subtilis fester in die ribosomale A-Seite von Poly-A-programmierten Ribosomen als spezifische t-RNA^{Lys} U 54 (Albani et al., 1978).

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß in eukaryontischen Zellen nur wenige U 54-haltige t-RNAs an Polysomen vorkommen. Die t-RNAs mit Uridin an der Position 54 akkumulieren vorzugsweise im Cytosol.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren:

t-RNAs der Klasse, die an der Position 54 zum Teil Ribothymidin, zum Teil Uridin enthalten, werden

in der Proteinbiosynthese hauptsächlich als rT-haltige Molekülspezies eingesetzt, während sich die U-haltigen t-RNA Moleküle vornehmlich im Cytoplast finden. Dies gibt der Zelle die Möglichkeit, über die Methylierung von U 54 zu rT in einigen spezifischen t-RNAs die Translationsgeschwindigkeit zu regulieren.

Dies stimmt überein mit dem Befund, daß im vegetativen Stadium von *D. Discoideum* die Proteinbiosyntheserate und auch der rT-Gehalt der t-RNAs am höchsten sind. Mit Beginn der Entwicklung nehmen sowohl die Rate der Proteinbiosynthese als auch der rT-Gehalt der t-RNAs ab.

Palatnik et al. (1977) konnten zeigen, daß sich das Isoakzeptorenmuster der t-RNAs von vegetativ wachsendem *D. Discoideum* unterscheidet von dem des Preaggregationsstadiums. Die Unterschiede betreffen hauptsächlich die spezifischen t-RNAs für die Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure und Tyrosin. Unterschiede im Muster dieser isoakzeptierenden t-RNAs wurden in vielen biologischen Systemen gefunden; in Tumorzellen, in Virus-transformierten Zellen und in Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen wachsen (Sueoka und Sueoka, 1970, Littauer und Inouye, 1973, Borek und Kerr, 1972). Die Analyse der Primärstruktur zeigte, daß diese t-RNAs häufig die Modifikation Q ($=7-(4,5\text{-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-yl-aminomethyl})-7\text{-deazaguanosin}$) oder Q^+ (ein Derivat von Q, das am Cyclopentendiol-Ring glykosidisch mit einer Mannose oder Galaktose verknüpft ist) in der 1. Position des Antikodons enthalten (Kavir et al., 1975 und Wesnick und White, 1972).

Die funktionelle Rolle dieser Modifikation wird zur Zeit intensiv untersucht. Aus Eukaryonten wurde ein Enzym isoliert, das die Modifikation Q gegen ein Guanin auszutauschen vermag, ohne die Nukleotidkette aufzu-

schneiden (Farkas und Singh, 1973, Okada et al., 1976). t-RNAs aus verschiedenen Experimentaltumoren sind bezüglich dieser Modifikation untermodifiziert, während Rattenleber-t-RNAs nahezu vollständig modifiziert sind (Okada et al., 1978). Allen Systemen, in denen Änderungen im Q-Gehalt spezifischer t-RNAs beobachtet wurden, ist gemeinsam ein Stadium veränderter Translation bestimmter m-RNAs. So ändert sich z.B. in *Drosophila* eine t-RNA^{Asn} isoakzeptierende Spezies zu dem Zeitpunkt, zu dem sich auch die Synthese spezifischer Proteine ändert. Für die Regulation der m-RNA Translation diskutierten schon White und Tener (1973) die Beteiligung von Initiationsfaktoren und von t-RNA Isoakzeptoren.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß der Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₂ die Modifikation Q enthält. Der Gehalt dieses Isoakzeptors nimmt während der Preaggregation zu. Der während der Preaggregation synthetisierte Isoakzeptor enthält ferner ein Uridin an der Position 54; er gehört zu der Klasse von t-RNAs, die zum Teil Uridin, zum Teil Ribothymidin an der Position 54 enthalten.

In *D. discoideum* löst der Mangel bestimmter essentieller Aminosäuren allein den Entwicklungszyklus aus (Marin, 1976). In diesem Organismus, aber auch in anderen Zellsystemen bewirkt der Entzug von Aminosäuren oder die Hemmung der Proteinbiosynthese durch ein Aminosäureanalogon einen partiellen Abbau von Polysomen. Die verbleibenden Polysomen haben eine geringere Größe. Vaughan und Hansen (1973) vermuteten, daß dieser Polysomenzerfall vornehmlich durch einen Block der Initiation der Proteinbiosynthese verursacht wird. Unklar ist bisher, warum andere Aminosäuren als Methionin die Initiation verhindern können. Lodish nimmt an, daß bei *D. discoideum* für den Abbau der Polysomen die Inaktivierung eines spezifischen Initiationsfaktors verantwortlich ist (Jacobson und Lodish, 1975, Alton und Lodish, 1977).

Nach Messen des Beladungszustandes der t-RNAs in vivo haben wir beobachtet, daß in *D. Discoideum* zwei Minuten nach Entzug des Mediums die t-RNA^{Asn}₂ nur noch zu 30% beladen ist. Zu diesem Zeitpunkt ist die t-RNA^{Asn}₃ vollständig unterbeladen, während die Restbeladung ausschließlich im Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₂ zu finden ist. Bindet der Isoakzeptor t-RNA^{Asn}₃, der keine Q-Base enthält, an sein entsprechendes Anticodon, so wird die Translation auf der Elongationsstufe blockiert. Danach kann die t-RNA^{Asn}₃ ein Signal sein, das den Polysomenzerfall auslöst. Die beladene t-RNA^{Asn}₂ könnte den völligen Abbau von Polysomen verhindern. Sie wird während der Preaggregation vermehrt synthetisiert und enthält die Q-Base.

Ogilvie et al. (1979) haben gezeigt, daß in Ehrlich Ascites Tumorzellen eine signifikante Reduktion in der Proteinbiosynthese durch eine t-RNA erreicht werden kann, die nur zu 50% beladen ist.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die m-RNA-Translation inhibiert wird in Zellen, die mit Interferon behandelt wurden. Diese Hemmung betrifft sowohl die Elongation als auch die Initiation der Proteinbiosynthese (Ilan und Ilan, 1975, Content et al., 1975, Kerr et al., 1976, Kerr et al., 1974, Samuel, 1976). Da Aminosäureentzug diesen Effekt noch verstärkt, nimmt man an, daß Interferon eine Aktivität induziert, die die Aminoacyl-t-RNA deacyliert (Sen et al., 1976).

Diese Beobachtungen stützen unsere Vermutung, daß das erste Signal, das den Block der Translation bestimmter m-RNAs in *D. Discoideum* auslöst, die unterbeladene t-RNA^{Asn}₃ ist.

Die Menge an beladener Q-haltiger t-RNA^{Asn}₂ in dieser frühen Entwicklung von *D. Discoideum* könnte den Gehalt an aktiven Ribosomen kontrollieren, die an der Synthese von spezifischen Proteinen der frühen Entwicklung beteiligt sind. Während dieser Phase nimmt nämlich auch der Gehalt dieses Isoakzeptors stark zu.

Es konnte ferner gezeigt werden, daß der Q-haltige Isoakzeptor $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ weniger Asparagin benötigt, um von der Synthetase beladen zu werden, als der Isoakzeptor $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$. Dies könnte der molekulare Mechanismus dafür sein, daß in einem Stadium, in dem Aminosäuremangel herrscht, die $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ beladen ist, während die $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ völlig deacyliert vorliegt.

Ob nur die Modifikation Q hierfür verantwortlich ist, bleibt offen. Obwohl sich die beiden Hauptisoakzeptoren $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ und $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ in ihrer elektrophoretischen Mobilität und in ihrem RNAase T₁ Oligonukleotidspaltungsmuster stark ähneln, weisen sie neben der Modifikation Q einige andere Unterschiede auf. So enthält die $t\text{-RNA}_{3}^{\text{Asn}}$ zusätzlich die Modifikation t⁶A und größere Mengen Gm, während in der $t\text{-RNA}_{2}^{\text{Asn}}$ O und ein bisher nicht identifiziertes Nukleosid gefunden wurden.

Es ist daher möglich, daß die beiden asparagin-spezifischen Isoakzeptoren sich nicht nur durch posttranscriptionale Modifikation voneinander unterscheiden. Es könnte sich ebensogut auch um heterogeneische Isoakzeptoren handeln, die je nach Entwicklungsstadium in unterschiedlichem Maße transkribiert werden.

Beide asparaginspezifischen Isoakzeptoren sind regulatorisch an der m-RNA Translation beim Übergang von vegetativen Stadium zum Entwicklungszyklus in Dictyostelium Discoideum beteiligt.

Literaturverzeichnis

Albani, M. (1979)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Albani, M., Hoburg, A., Kersten, H. Wurmbach, P. und
Nierhaus, K.H. (1978)

12th FEBS-MEETING Dresden, Abstract No. 1658

Allandeen, H.S., Yang, S.K. und Söll, D. (1972)

FERS Letters 28, 205 - 208

Alton, T.H. und Lodish, H.F. (1977)

Cell 12, 301 - 310

Agris, P.F., Koh, H. und Söll, D. (1973)

Arch. Biochem. Biophys. 154, 277 - 282

Ashworth, J.M. und Watts, D.J. (1970)

Biochem. J. 119, 175 - 182

Berg, P., Bergman, F.H., Ofengand, E.J. und

Dieckmann, M. (1961)

J. Biol. Chem. 236, 1726 - 1736

Beug, H. Katz, F.E. und Gerisch, G. (1973)

J. Cell Biol. 56, 647 - 658

Björk, G.R. und Isaksson, L.A. (1970)

J. Mol. Biol. 51, 83 - 100

Björk, G.R. und Neidhardt, F.C. (1971)

Cancer Res. 31, 706 - 709

Björk, G.R. und Neidhardt, F.C. (1975)

J. Bacteriol. 124, 99 - 111

Böcker, R. (1975)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Bonner, J.T. (1969)

Sci. Amer. 220, 78 - 91

Bonner, W.M. und Laskey, R.A. (1974)

Eur. J. Biochem. 46, 83 - 88

Borek, E. und Kerr, S.J. (1972)

Adv. Canc. Res. 15, 163 - 190

Briscoe, W.T., Griffin, A.C., McBride, C. und Bowen, T.M.
(1975)

Cancer Res. 75, 2586 - 2593

Ceccarini, C. und Maggio, R. (1968)

Biochim. Biophys. Acta 166, 134 - 141

Chia, L.L.S.Y., Morris, P., Randerath, K. und
Randerath, E. (1976)

Biochim. Biophys. Acta 425, 49 - 62

Clark, B.F.C. (1978)

in: Transfer-RNA ed. S. Altman, Cell Monographie Series
The MIT Press, Cambridge, Mass. and London, England

Content, J., Leblau, B., Nudel, U., Zilberstein, A.
Berissi, H. und Revel, M. (1975)

Eur. J. Biochem. 54, 1 - 10

Cotter, D.A. und Raper, K.B. (1968)

J. Bacteriol. 96, 86 - 92

Crick, F.H.C. (1966)

J. Mol. Biol. 19, 548 - 555

Dingermann, Th., Mach, M. und Kersten, H. (1979a)

J. Gen. Microbiol. im Druck

Dingermann, Th., Pistel, F. Kersten, H. (1979)

Eur. J. Biochem. in Druck

Dingermann, Th., Schmidt, W., Kersten, H. (1977)
FEBS Lett. 80, 205 - 208

Durston, A. (1974)
Develop. Biol. 37, 225 - 235

Erdmann, V.A. (1977)
in: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular
Biology, ed. W.E. Cohn, Vol. 18
Academic Press, New York, London, S. 45 - 90

Erdmann, V.A., Sprinzl, M. und Pongs, O. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 942 - 948

Farkas, W.R. und Singh, R.D. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 7780 - 7785

Firtel, R.A. und Lodish, H.F. (1973)
J. Mol. Biol. 79, 295 - 314

Fradin, A. Gruhl, H. und Feldmann, H. (1975)
FEBS Lett. 50, 185 - 189

Franke, J. und Kessin, R. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 2157 - 2161

Freeze, H. und Loomis, W. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 820 - 824

Gauss, D.H., Grüter, F. und Sprinzl, M. (1979)
in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology,
Ablson, I., Schimmel, P.R. und Söll, D. (Ed.), im Druck

Gauss, D.H., Grüter, F. und Sprinzl, M. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, r1 - r19

Gross, H.J., Simek, M. Raba, M. Heckman, J. und
RajBandary, U.L. (1974)
Nucleic Acids Res. 1, 35 - 43

Grupa, R.C. und Randerath, K. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 3443 - 3458

- Hansen, B.S., Vaughan, M.H. und Wang, L. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3854 - 3857
- Hassur, S.M. und Whitlock, H.W. (1974)
Anal. Biochem. 59, 162 - 164
- Hervé, G. und Chapeville, F. (1965)
J. Mol. Biol. 13, 757 - 766
- Hiroshi, A., Masaaki, U., Yoshimasa, T. und Hazime, S.
(1976)
Tetrahydron Letters 42, 3807 - 3810
- Ilan, J. und Ilan, J. (1975)
Dev. Biol. 42, 64 - 74
- Jacobson, A. und Lodish, H.F. (1975)
Annu. Rev. Genet. 9, 143 - 185
- Kasair, H., Kuchino, Y., Nikei, K. und Nishimura, S.
(1975)
Nucleic Acids Res. 2, 1931 - 1939
- Katz, E.R. und Bourguignon, L. (1974)
Dev. Biol. 36, 82 - 87
- Katze, J.R. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 383, 131 - 139
- Keith, G., Dirheimer, G. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 517, 133 - 149
- Keith, G., Picand, F., Weissenbach, J., Ebel, J.P. und
Dirheimer, G. (1973)
FEBS Letters 31, 345 - 347
- Kerr, J.M., Brown, R.E. und Gilbert, M.J. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3136 - 3140

Kerr, J.M., Friedmann, R.M., Brown, R.E., Ball, L.A.
und Brown, J.C. (1974)
J. Virol. 13, 9 - 21

Kim, S.H. (1978)
in: Transfer-RNA ed. S.Altmann,
Cell Monographie Series, The MIT Press, Cambridge, Mass.
and London, England, S. 248 - 293

Leach, C.K. und Ashworth, J.M. (1972)
J. Mol. Biol. 63, 35 - 48

Littauer, U.Z. und Inouye, H. (1973)
Annu. Rev. Biochem. 42, 439 - 470

Lodish, H.F., Alton, T., Dettin, R.P., Weiner, A.M.
und Margolskee, J.P. (1976)
in: The Molecular Biology of Hormone Action
(Edited by J. Papaconstantinou) Academic Press, Inc.
S. 75 - 103

Loomis, W.F. (1975)
Dictyostelium Discoideum, Academic Press, New York

Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.J. und
Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

Malchow, D., Nägele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G.
(1972)
Eur. J. Biochem. 28, 136 - 142

Mandel, C.R. und Borek, E. (1963)
Biochemistry 2, 555 - 560

Marin, F.T. (1976)
Develop. Biol. 48, 110 - 117

Nishimura, S. (1972)
Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 12, 49 - 85

- Nishimura, S. (1978)
in: Transfer-RNA ed. S. Altman, Cell Monographie Series
The MIT Press, Cambridge, Mass. and London, England
- Ofengand, J. und Henes, C. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6241 - 6253
- Ogilvie, A. Muschka, U. und Kersten, W. (1979)
Biochim. Biophys. Acta im Druck
- Okada, N., Harada, F. und Nishimura, S. (1976)
Nucleic Acids Res. 3, 2593 - 2603
- Okada, N., Shindo - Okada, N., Sato, S. H., Itoh, Y.,
Oda, K.J. und Nishimura, S. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4247 - 4251
- Palatnik, C.M., Katz, E.R. und Brenner, M. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 694 - 703
- Pillinger, D. und Borek, E. (1969)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1145 - 1150
- Raettig, R. (1976)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Rahmsdorf, H.J. (1977)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 527 - 529
- Randerath, E. Yu, C.T. und Randerath, K. (1972)
Anal. Biochem. 48, 172 - 198
- Raper, K.B. (1935)
J. Agr. Res. 50, 135 - 147
- Reszelbach, R., Greenberg, R., Pirtle, R., Prasad, R.,
Marcu, K. und Dudock, B. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 475, 383 - 392
- Rich, A. und RajBhandary, U.L. (1976)
Annu. Rev. Biochem. 45, 805 - 860

- Richter, D., Erdmann, V.A. und Sprinzl, M. (1973)
Nature New Biology 246, 132 - 135
- Roberts, I.W. und Carbon, J. (1974)
Nature New Biology 250, 412 - 414
- Roe, B.A., Michael, M. und Dudock, B. (1973)
Nature New Biology 246, 135 - 139
- Roe, B.A. und Tsen, H.G. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3696 - 3700
- Rogg, H., Brambilla, R., Keith, G. und Staehelin, M.
(1976)
Nucleic Acids Res. 3, 285 - 295
- Rogg, H., Wehrli, W. und Staehelin, M. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 195, 13 - 15
- Rossomando, E.F. und Sussman, M. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 604 - 610
- Samuel, C.E. (1976)
Virology 75, 166 - 176
- Sanger, F. und Brownlee, G.G. (1967)
Meth. Enzym. 12, 361 - 381
- Scharma, O.K. und Borek, E. (1970)
J. Bacteriol. 101, 705 - 708
- Schlegel, R.A., Iversen, P. und Rechsteiner, M. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 3715 - 3729
- Schmidt, W. (1977)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Schmidt, W., Arnold, H.H. und Kersten, H. (1976)
J. Bacteriol. 129, 15 - 21

- Schmidt, W., Kersten, H. und Schweiger, H.G. (1977)
in: Progress in Acetabularia Research, ed. C.L.F. Woodcock
s. 39 - 43, Academic Press, New York, San Francisco, London
- Schwarz, U., Lührmann, R. und Gassen, H.G. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 807 - 814
- Schwarz, U., Menzel, H. M. und Gassen, H.G. (1976)
Biochemistry 15, 2484 - 2490
- Sen, G.C., Gupta, J.L., Brown, R.E., Leblen, B.,
Rebello, M.A. und Lengyel, P. (1976)
J. Virol. 17, 191 - 203
- Siberklang, M., Gillum, A.M. und RajBhandary, U.L. (1979)
Meth. Enzym. 59, 58 - 109
- Singer, C.E., Smith, G.R., Cortese, R. und Ames, B.N.
(1972)
Nature New Biology 238, 72 - 74
- Sueoka, N. und Sueoka, T. (1970)
Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 10, 23 - 55
- Sussman, M. und Sussman, R.P. (1969)
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19, 403 - 435
- Takeuchi, I. (1969)
in: Nucleic Acid Metabolism Cell Differentiation and
Cancer Growth (E.V. Cowdry und S. Seno, eds.)
S. 297 - 304, Pergamon Press, Oxford.
- Vaughan, M.H. und Hansen, B.S. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 7087 - 7096
- Watts, D.J. (1977)
J. Gen. Microbiol. 98, 355 - 361
- Watts, D.J. und Ashworth, J.M. (1970)
Biochem. J. 119, 171 - 174

Weeks, G. (1973)

Exp. Cell. Res. 76, 467 - 470

White, B.N. und Tener, G.M. (1973)

Biochim. Biophys. Acta 312, 267 - 275

White, B.N., Tener, G.M., Holden, J. und Suzuki, D.T.
(1973)

J. Mol. Biol. 74, 635 - 651

White, G.J. und Sussman, M. (1961)

Biochim. Biophys. Acta 53, 285 - 293

Wosnik, M.A. und White, B.N. (1979)

Biochim. Biophys. Acta 561, 194 - 205

Yaggura, T. Yanagisawa, M. und Iwabuchi, M. (1976)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 183 - 189

Yang, W.K. und Novelli, G.D. (1971)

Meth. Enzym. 20, 44 - 55

Yoshida, M., Takeishi, K. und Ukita, T. (1970)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 852 - 857

Frau Professor Dr. H. Kersten danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, die stets freundliche Unterstützung und die durch ständige Diskussionsbereitschaft mögliche intensive Betreuung.

Herrn Professor Dr. W. Kersten danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die viele Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. G. Gerisch, Max Planck Institut, München, danke ich für die Überlassung des Schleimpilzes Dictyostelium Discoideum, Stamm AX-2.

Bei Fräulein Ulrike Lösel bedanke ich mich für die wertvolle technische Unterstützung.

Für hilfreiche Diskussionen und zahlreiche Anregungen bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes.

Lebenslauf

Am 10.7.1948 wurde ich, Theo Dingermann, als erster Sohn von Karl Dingermann und seiner Ehefrau Margarethe, geborene van Betteraey, in Kevelaer geboren.

Von 1954 - 1958 besuchte ich die St. Antonius Volksschule in Kevelaer und von 1958 - 1968 das Kardinal-von-Galen Gymnasium in Kevelaer, an dem ich am 7.6.1968 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 68/69 und im Sommersemester 69 war ich an der Universität Bonn, im Wintersemester 69/70 an der Universität Köln in der naturwissenschaftlichen Fakultät immatrikuliert.

Von 1970 - 1973 arbeitete ich in der Clemens-Apotheke in Krefeld-Fischeln als Apothekerpraktikant und bestand am 3.3.1972 die pharmazeutische Vorprüfung.

Im Sommersemester 73 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Pharmazie, das ich am 12.11.1976 mit dem Staatsexamen abschloß.

Am 25.11.1976 erhielt ich die Approbation als Apotheker.

Am 21.8.1972 heiratete ich meine Frau Gertrud, geborene Ruffen.

Die vorliegende Arbeit wurde seit Januar 1977 in der Arbeitsgruppe Biochemie unter Leitung von Frau Prof. Dr. H. Kersten erstellt.

